

Title	リン酸化酵素および低分子量Gタンパク質の活性を可視化する1分子型FRETバイオセンサーの合理的設計(Dissertation_全文)
Author(s)	小松, 直貴
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2014-03-24
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18424">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18424</a>
Right	許諾条件により要旨は2014-04-01に公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

リン酸化酵素および低分子量 G タンパク質の活性  
を可視化する 1 分子型 FRET バイオセンサーの  
合理的設計

小松 直貴

## 目次

	ページ
表紙 . . . . .	1
目次 . . . . .	2
要旨 . . . . .	3
序論 . . . . .	4
方法 . . . . .	6
結果 . . . . .	14
考察 . . . . .	37
謝辞 . . . . .	40
参考文献 . . . . .	41

## 要旨

蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)の原理に基づくバイオセンサーは生細胞内にて分子活性の時空間動態を可視化できる点で、極めて有用なツールである。なかでも 1 分子型 FRET バイオセンサーは、高感度かつ解析方法の容易さから広く用いられている。しかしながら 1 分子型 FRET バイオセンサーはその開発および最適化に多大な時間と労力を要し、これがバイオセンサー普及の大きな障害となっていた。この問題を克服するために、本研究では、高感度 FRET バイオセンサーの簡便かつ合理的な設計法を検討し、これが種々のシグナル伝達分子に適用可能か実験的に検証することを試みた。

1 分子型 FRET バイオセンサーは、その動作原理から、角度依存型と距離依存型の 2 種類に分類される。角度依存型 FRET バイオセンサーは、ドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質間の角度によって FRET 効率が変化する。一方、距離依存型 FRET バイオセンサーは蛍光タンパク質間の距離によって FRET 効率が変化する。本研究ではバイオセンサーから角度依存性を排除し、完全な距離依存型とすることで多数のシグナル伝達分子に対する汎用性を高めることを目指した。その上でバイオセンサーの最適化を試みた。

まずバイオセンサー骨格を成すドナーとアクセプター蛍光タンパク質のペア、およびそれぞれを結合するリンカーの長さについてプロテインキナーゼ A (PKA)の活性センサーを用いて検討した。その結果、ドナー/アクセプターペアについては GFP 変異体分子間の 2 量体化効果を適度に高めた変異体を利用すること、またリンカーについては現行のものより数倍長い 116 アミノ酸から 244 アミノ酸の柔軟なリンカーを用いることでセンサーの刺激依存的な FRET 効率の上昇(ゲイン)が飛躍的に向上することを見出だした。またドナー/アクセプターペア間の 2 量体化効果、およびリンカーの長さの関係について数理モデルを構築して検討を行ったところ、上記の手法がバイオセンサーのゲインを高める最適な設計手法であることを支持する結果を得た。

続いて、上記の手法により最適化した PKA 活性センサーのバックボーンを既存のシグナル伝達分子に対する FRET バイオセンサーに適用し、従来型からの改善がみられるか検証を行った。その結果、PKA 以外にも ERK、JNK、EGFR/Abl、Ras および Rac1 のバイオセンサーに対してそれらのゲインを従来型の数倍に向上させることができた。我々はさらにこのバックボーンを用いて RSK、S6K、Akt、PKC に対するバイオセンサーを新規に開発することに成功した。すなわち本バックボーンが複数のシグナル伝達分子に対する高い汎用性を持ち、FRET バイオセンサー開発を加速しうることを示すことができた。

最後に、作製した ERK 活性センサーを用いることでキナーゼ阻害剤の新規評価系を開発した。本法はこれまで試験管内にて行われてきたキナーゼ阻害剤評価を生細胞内にて定量的に評価する画期的な手法となりうる。本研究で作製された 1 分子型 FRET バイオセンサーのバックボーンを用いることで、種々のシグナル伝達分子に対する FRET バイオセンサーを簡便に開発可能である。これによりシグナル伝達機構のより詳細な理解が進むことが期待される。

## 序論

蛍光共鳴エネルギー移動[Förster (または fluorescence) resonance energy transfer (FRET)]は2つの蛍光団の間でドナー側からアクセプター側へ非輻射的にエネルギーが移動する現象である<sup>1</sup>。この過程はドナー蛍光団の蛍光スペクトルとアクセプター蛍光団の励起スペクトルの重なり、ドナー・アクセプターの距離、および両者の双極子遷移モーメントの相対的配向(角度)に依存する(図1)<sup>2</sup>。近年、蛍光タンパク質について数多くの蛍光色変異体が報告されている<sup>3</sup>。こうした蛍光タンパク質変異体を利用することにより、FRETの原理に基づくバイオセンサー(以下 FRET バイオセンサー)を遺伝子工学的に作製することが可能になった。また FRET バイオセンサーを動物細胞に遺伝子導入することで、従来の生化学的手法では困難であった、生細胞内におけるシグナル伝達分子の時空間動態を計測することができる。実際、FRET バイオセンサーは、細胞内シグナル伝達分子— $\text{Ca}^{2+}$ 、リン脂質、低分子量 G タンパク質、プロテインキナーゼなど—の活性・濃度変化を可視化、計測する目的で広く用いられている<sup>2,4</sup>。

蛍光タンパク質を利用した FRET バイオセンサーは2種類に大別される。一つは1分子型(分子内) FRET バイオセンサーであり、もう一つは2分子型(分子間) FRET バイオセンサーである<sup>2</sup>。前者は単一分子内にドナー蛍光タンパク質およびアクセプター蛍光タンパク質を有しており、後者はドナーおよびアクセプター蛍光タンパク質のそれぞれに他の分子を結合させ、別々に細胞内に発現させるものを指す。とりわけ1分子型 FRET バイオセンサーは S/N 比が高い、簡単に細胞に導入できる、単純なレシオメトリーで解析可能、といった点で2分子型 FRET バイオセンサーより優れており、細胞生物学の分野で幅広く用いられている<sup>2,4</sup>。

このように複数の利点を持つ一方、1分子型 FRET バイオセンサーの最大の欠点として、その”開発および最適化が非常に困難である”ことが挙げられる。これはセンサー内のタンパク質またはドメインの種類や配置を変える事によってバイオセンサーの立体構造が変化し、結果として FRET ドナー・アクセプター間の距離および相対的配向(角度)が変化することに起因する<sup>1,5</sup>。この理由により、相互作用し得る任意のタンパク質の組をセンサー分子内に配置しただけでは FRET 効率の十分な変化が見られない場合が多い。結果、十分な FRET 効率の変化を得るためにバイオセンサーの最適化が必須となる。この最適化に関して、これまでに複数のグループが FRET バイオセンサーに適した蛍光タンパク質を発表している<sup>6-8</sup>。しかしながら、バイオセンサーに最適な蛍光タンパクのペアは一意には定まらず、バイオセンサーごとに検討が必要である<sup>9</sup>。既存の結晶構造から FRET バイオセンサーのとり得る構造およびそれに最適な蛍光タンパクを予測する試みもなされてはいるが、現状では一般化された手法とは言い難い<sup>10</sup>。概して、バイオセンサーの開発にはトライアンドエラーによる検討が必須であり、多大な時間と労力が費やされる。この効率の悪さが1分子型バイオセンサーの開発を妨げる大きな要因の一つといえる。

この技術的制約を克服すべく、本研究では種々のシグナル伝達分子の可視化に適用できる1分子型 FRET バイオセンサーの共通のバックボーンを合理的にデザインし、開発することを

目指した。その結果、最適な蛍光タンパク質の選択とこれまでより数倍～数十倍長いリンカーをバックボーンに組み込むことにより、FRET バイオセンサーのゲインを劇的に高めることに成功した。続いて得られたバックボーンを既報の PKA、ERK、JNK、EGFR/Abl、Ras および Rac1 のバイオセンサーに適用することで、ゲインが劇的に上昇することが確認できた。また RSK、S6K、Akt および PKC に対する新規の FRET バイオセンサーをこれまでと比較して簡便に開発することができた。最後に改良型の ERK 活性センサーの安定発現株を用いることで、種々のキナーゼ阻害剤が ERK 活性に与える影響を生細胞内にて定量的に評価する系を構築することができた。

## FRET に寄与する因子

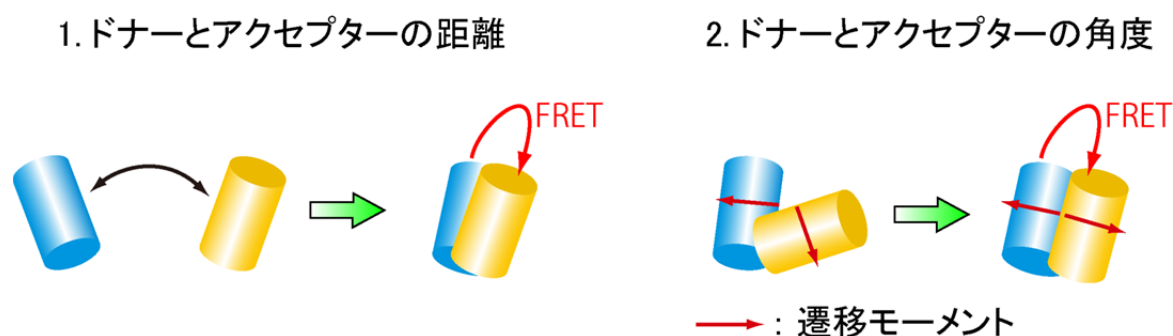


図 1. シアン色蛍光タンパクと黄色蛍光タンパク間の FRET およびそれに影響する因子  
FRET ドナーとしてシアン色蛍光タンパク (CFP)、FRET アクセプターとして黄色蛍光タンパク (YFP) を用いた場合、ドナー・アクセプター間の FRET 効率は 1.ドナー・アクセプター間の距離の 6 乗に反比例する。また、2.ドナー・アクセプターそれぞれの発色団の双極子遷移モーメントが平行に位置するときに最大、直交するときに 0 となる。

## 方法

### FRET バイオセンサーの構築

FRET アクセプターおよびドナーとして以下の黄色およびシアン色蛍光タンパク質を用いた。黄色蛍光タンパク質: Venus<sup>11</sup>, 円順列変異型(cp) Venus (cp50Venus, cp157Venus, cp173Venus, cp195Venus, cp229Venus)<sup>5</sup>, mCitrine<sup>12</sup>, および YPet<sup>8</sup>. シアン色蛍光タンパク質: ECFP, CyPet<sup>8</sup>, mTFP1<sup>3</sup>, mTurquoise, mTurquoise-GL<sup>13</sup>, および SECFP (ECFP の明るさを高めた変異体。理化学研究所脳科学研究センター、宮脇敦史博士に供与して頂いた)。以上の蛍光タンパク質をコードする cDNA を PCR により増幅し、バイオセンサー構築に用いた。なお、SECFP は ECFP と比較して以下の変異が導入されている: K26R, D129G, N164H, および S175G. mTurquoise および mTurquoise-GL は T. W. J. Gadella Jr. 博士 (Swammerdam 生命科学研究所, アムステルダム) に供与して頂いた<sup>13</sup>。mTurquoise および mTurquoise-GL に含まれる 206 番目の Lys 残基は 2 段階の PCR 反応により Ala に置換し、それぞれ Turquoise, Turquoise-GL とした<sup>13</sup>。これら cDNA は真核生物用発現ベクターである、pCAGGS<sup>14</sup> および pPBbsr に導入した。後者は Blasticidin S 耐性遺伝子を選択マーカーとして有している<sup>15</sup>。クローニングに用いた制限酵素サイトを図 2C に示している。ERK 活性センサーである EKAR<sup>16</sup> は Addgene (<http://www.addgene.org/>) より購入した。PKA 活性センサーである AKAR3<sup>17</sup> および AKAR4<sup>18</sup>, JNK 活性センサーである JNKAR1<sup>19</sup> は Jin Zhang 博士 (ジョンズ・ホプキンス大学、ボルティモア) に供与して頂いた。

本研究にて作製したリンカー群は、20 アミノ酸からなるペプチド、SAGGSAGGSAGGSAGGSAGG をさまざまな数で繰り返した配列からなる<sup>20</sup>。これらリンカー群をコードする cDNA は制限酵素処理 cDNA 断片、もしくはアニール済み合成オリゴ DNA<sup>2</sup> 本鎖をベクターへライゲーションすることで導入した。以下リンカーの長さを“X aa リンカー”もしくは“(プラスミド名)-X”の表記で示す(X: リンカーを構成するアミノ酸の数)。

20 aa リンカーはセンスオリゴ鎖

(5'-GTACCAGTGCTGGTGGTAGTGCTGGTGGTAGTGCTGGTGGTAGTGCTGGTGGTAGTGCTGGTGGTT-3') およびアンチセンス鎖

(5'-CCGGAACCACCAGCACTACCACCAGCACTACCACCAGCACTACCACCAGCACTACCA CCAGCACTG-3') をアニールさせ、続いて PKA 活性 FRET バイオセンサーの発現ベクターに導入し pAKAR3-20 を作製することで得た。次に pAKAR3-20 を EcoRI/Aor13HI もしくは EcoRI/Asp718 のセットで制限酵素処理し、20 aa リンカーを含む断片を以下の合成オリゴ DNA のアニール産物とともにライゲーションした。センス鎖:

(5'-CCGGCAGTGCTGGTGGTAGTGCTGGTGGTA-3') およびアンチセンス鎖:

(5'-GTACTACCACCAGCACTACCACCAGCACTG-3')。これにより pAKAR3-52 を作製すること

で 52 aa リンカーを得た。このステップを繰り返すことにより、84, 116, 180, 244 aa リンカーをそれぞれ得た。

本研究で作製した 116 aa リンカー (EV リンカー) を有するセリン・スレオニンキナーゼ FRET バイオセンサー、Eevee およびそれをコードするプラスミド pEevee は pRaichu-Ras を基に作製した<sup>21</sup>。pEevee は N 末端側から以下の配列を含んでいる: YPet、スパーサー (Leu-Glu)、酵母 Rad53 の FHA1 ドメイン (aa 241-382, リガンドドメインとして使用)、スパーサー (Gly-Thr)、EV リンカー、スパーサー (Ser-Gly)、セリン・スレオニンキナーゼの基質配列 (センサードメインとして使用)、スパーサー (Gly-Gly-Arg)、ECFP、スパーサー (Ser-Arg)、および局在化シグナル。局在化シグナルとして以下を用いた: HIV-1 rev タンパク質の核外移行シグナル (NES) (LQLPPLERLTLD)、または SV40 large T 抗原の核内移行シグナル (NLS) (GGPPKKKKPKVEDP) および Ki-Ras4B の C 末端ファルネシル化配列 (KMSKDGGKKKKKSKTKCVIM)。Eevee-Akt および Eevee-PKC については YPet の N 末端にヒト Akt1 の PH ドメイン (aa 5-152) またはヒト PKC $\beta$  の C1 ドメイン (aa 5-121) をそれぞれ含む。EKAREV では FHA1 ドメインのかわりにヒト Pin1 の WW ドメイン (aa 241-295) をリン酸化ペプチド結合ドメインとして用いた。基質ペプチドをコードする cDNA はリン酸化をうける残基を Thr とし、Thr から +3 の位置にあるアミノ酸を Asp に置換することで、リン酸化された基質が FHA1 ドメインと結合するように設計した。同様に WW ドメインをリガンドドメインとして使用する場合はリン酸化される Thr から +1 の位置にあるアミノ酸を Pro に置換した。基質の導入は基質をコードする合成オリゴ DNA をアニールし、得られた 2 本鎖を発現ベクターとのライゲーションにより行った。本研究で用いた基質配列を表 2 に記載する。

PicchuEV をコードするプラスミドの作製には、リガンドドメインとしてヒト CrkII の SH2 および SH3 ドメイン (aa 1-204) を用いた。またセンサードメインとしてヒト CrkII の部分配列 (aa 217-225) を用いた。センサードメインの導入は CrkII (aa 217-225) をコードする DNA 配列を含むプライマーを用いて SECFP を増幅し、増幅断片を制限酵素処理に引き続くベクターとのライゲーションにより行った。pRaichuEV-Ras および pRaichuEV-Rac1 は元のプラスミドである pRaichu-Ras および pRaichu-Rac1 のリンカー部分を EV リンカーに置換することで作製した<sup>21,22</sup>。



表1. 本研究で用いたYFPおよびCFP変異体に含まれるアミノ酸置換

蛍光タンパク		変異 <sup>a</sup>
YFP	Venus	F46L T65G V68L S72A M153T V163A S175G T203Y
	YPet	F46L T65G V68L S72A M153T V163A S175G T203Y S208F <sup>b</sup> V224L <sup>d</sup> H231E D234N
	mCitrine	L64F T65G V68L Q69M S72A T203Y A206K <sup>c</sup> del228-238
CFP	ECFP	Y66W N146I M153T V163A
	SECFP	K26R Y66W D129G N164H M153T V163A N164H S175G
	Turquoise	T65S Y66W S72A N146I M153T H148D V163A S175G
	Turquoise-GL	T65S Y66W S72A N146I H148G M153T V163A S175G V224L <sup>d</sup>
	CyPet	T9G V11I D19E Y66W A87V N146I M153T V163A I167A E172T L194I

<sup>a</sup>EGFP との比較(EGFP: GenBank Accession number U76561)

<sup>b</sup>S208F 変異は GFP 変異体との 2 量体化を促進する<sup>23</sup>。

<sup>c</sup>A206K 変異は GFP 変異体との単量体化を促進する<sup>8</sup>。

<sup>d</sup>V224L 変異は S208F 変異と相乗的に GFP 変異体の 2 量体化を促進する<sup>24</sup>。

表2. 基質の導入に用いた合成オリゴDNA

キナーゼ	基質の由来	基質配列 <sup>a</sup>	フォワード鎖 <sup>b</sup>	リバース鎖 <sup>b</sup>
PKA	PKA consensus	LRRA <sup>T</sup> LVD <sup>c</sup>	ccggaTTGAGGCGCGCGACGCTGGTTGACggc	ggccgcgcGTCACACGACGCTCGCGCGCCTCAAt
ERK	Cdc25C (T48)	PDVPR <sup>T</sup> PV <sup>D</sup> KAKLS <sup>F</sup> QFP <sup>d</sup>	ccggaCCAGATGTCCCTAGAACTCCAGTGGATAAAG CAAAGCTGTCAATTCCAAATTTCCGggc	ggccgcgcCGAAATTGGAATGACAGCTTTGCTTATC GGAGTTCTAGGGACATCTGgt
JNK	JDP2 (T148)	DSV <sup>K</sup> T <sup>P</sup> ED <sup>E</sup> GNP <sup>L</sup> LE <sup>Q</sup> LE <sup>K</sup> <sup>e</sup>	ccggaGACAGTGTCAAGACCCCGGAGGATGAAGGC AACCACCTGCTAGAGCAGCTTGAGAAAGAGggc	ggccgcctTTCCTCTCAAGCTGCTCTAGCAGTGGGTT GCCTTCATCTCTCGGGGCTCTTGACACTGTct
RSK	TSC2 (S1798)	GQRKRL <sup>T</sup> SV <sup>D</sup> DFTE	ccggaGGCCAGCGGAAGCGCCTCATCACCTCGGTG GACGACTTTCACCCGAGggc	ggccgcctTCGGTGAAGTCGTCCACCGAGGTGATGA GGCGCTTCGCGCTGGCct
S6K	S6 (S240)	RLSSLRA <sup>T</sup> TS <sup>D</sup> SESS	ccggaAGACTTTCCTCTCTGCGAGCTACTACTTCTGA CTCTGAATCCAGTggc	ggccgcctACTGATTTCAGAGTCAGAAAGTAGTAGCTCG CAGAGAGAAAGTctt
S6K	Rictor (T1135)	NRRI <sup>R</sup> RTL <sup>T</sup> EP <sup>D</sup> VDFN	ccggaAACAGGGCGAATCAGAACACCTTACGGAGCCCCG ACGTTGATTTTAAAtggc	ggccgcctTAAAAATCAACGTCGGGCTCCGTAAGTGT TCTGATTCGCCGTtTt
Akt	Akt consensus	RKRDRLG <sup>T</sup> LGD <sup>f</sup>	ccggaGCGAAAAAGAGATAGATTGGGTACTTTAGGTG ATtggc	ggccgcctATCACCTAAAGTACCCAATCTACTCTTTT GCgt
PKC	MARCKS (S159)	KKKKK <sup>R</sup> F <sup>T</sup> FK <sup>D</sup> SFKL	ccggaAAGAGAGAGAGAGCGCTTTACCTTCAAGG ATTCTTTCAAGCTgggc	ggccgcctCAGCTTGAAAGAAATCCTTGAAGGTAAAGC GCTTCTTCTTCTTt
EGFR/Abl	CtkII (Y221)	EPGP <sup>Y</sup> AQPS	gtccggaGAGCCTGGGCCCTATGCCCAACCCAGCG <sup>g</sup> ggcgccgcATGTGTGAGCAAGGGCGAGGAG	GGCTCTAGACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTG <sup>h</sup>

<sup>a</sup> 赤、青、緑色はそれぞれリン酸化を受けるスレオニンもしくはチロシン、FHA1ドメインとの結合に必要なアスパラギン酸、キナーゼとの相互作用に必要な配列をそれぞれ示す。

<sup>b</sup> DNA配列はそれぞれ5'末端から3'末端に向けて配置されている。

<sup>c</sup> AKAR3で用いられている基質と同じ。

<sup>d</sup> EKARで用いられている基質、PDVPRTPVGKAKLSFQFPについて、リン酸化されるスレオニンから+3位のGをDに置換した。

<sup>e</sup> JNKARで用いられている基質と同じ。

<sup>f</sup> BKARで用いられている基質、RKRDRLGTLGIについて、リン酸化されるスレオニンから+3位のIをDに置換した。

<sup>g</sup> 基質配列をコードするDNA配列を含み、CFPのN末端にアニールするプライマー。

<sup>h</sup> CFPのC末端にアニールするプライマー。

## 細胞、試薬、および抗体

HeLa 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンク（泉南市、大阪、日本）より購入した。Cos-7 細胞は本研究では Y. Fukui 博士（National Research Institute of Health, 台湾, 中国）によって樹立された Cos-7/E3 細胞を用いた。HeLa 細胞および Cos-7 細胞は 10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用いて培養した。生細胞イメージングの際には HeLa および Cos-7 細胞をタイプ I-C コラーゲン（Nitta Gelatin Inc., 大阪, 日本）でコートした 35 mm ガラス底培養皿もしくは 96 穴ガラス底プレート（Asahi Techno Glass, 東京, 日本）に播種し、実験に供した。FRET バイオセンサーをコードするプラスミドのトランスフェクションは HeLa 細胞の場合は 293Fectin（Invitrogen, San Diego, CA）、Cos-7 細胞の場合は Lipofectamine2000（Invitrogen, San Diego, CA）をそれぞれ説明書に従って用いた。上皮成長因子（EGF）は Sigma-Aldrich より購入した。Dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP), TPA, Calyculin A, Anisomycin, PD153035, および JNK inhibitor VIII は Calbiochem (La Jolla, CA) より購入した。PD184352 は Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada) より購入した。BI-D1870 は Symansis (Shanghai, China) にて購入した。Rapamycin は LC Laboratories (Woburn, MA) にて購入した。PLX-4720 は Selleck Chemicals (Houston, TX) で購入した。*piggyBac* トランスポゼーの発現ベクターは Bradley 博士（Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK）<sup>15</sup> に提供して頂いた。Phos-tag は Phos-tag コンソーシアム (<http://www.phos-tag.com/>) より購入した。抗 GFP 抗血清は本研究室にて調製した。LI-COR ブロッキングバッファー、IRDye680 または IRDye800 標識抗マウス 2 次抗体、および抗ウサギ 2 次抗体は LI-COR Bioscience (Lincoln, NE) より購入した。

## リン酸化ペプチド親和性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

リン酸化ペプチド親和性ポリアクリルアミドゲル電気泳動は既報通りに行った<sup>25</sup>。具体的には 50  $\mu$ M Phos-tag および 100  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> を SDS ポリアクリルアミド分離ゲルに加えることでリン酸化ペプチド親和性ゲルとした。このゲルを用いて分離したタンパクを引続くウェスタンブロッティングにより解析した。蛍光標識 2 次抗体からのシグナルを Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience) により検出し、定量を行った。

## GTP 加水分解能の定量

Raichu バイオセンサー内の低分子量 G タンパク質に結合している GTP および GDP を既報に従って解析した<sup>26</sup>。具体的には Cos-7 細胞に Raichu-Ras, RaichuEV-Ras, Raichu-Rac1 または RaichuEV-Rac1 をトランスフェクションし、36 時間後に 0.05 mCi/ml [<sup>32</sup>P] 正リン酸を含むリン酸不含 DMEM 培地で 2 時間代謝標識した。その後 wash buffer で細胞を 2 回洗浄した後 TritonX-100 を含む lysis buffer で細胞を可溶化した。可溶化物を遠心して上清を回収し、抗 GFP 抗血清を用いて Raichu バイオセンサーを免疫沈降した。得られた免疫沈降産物から GTP および GDP を薄層クロマトグラフィーで分離し、<sup>32</sup>P のシグナルを BAS-1000 イメージアナライ

ザー（富士フィルム，東京）を用いて検出、定量した。

### タイムラプス FRET イメージング

タイムラプス FRET イメージングは基本的に既報通りの条件および方法にて取得、画像処理を行った<sup>27</sup>。具体的には、FRET バイオセンサーを発現する HeLa 細胞または Cos-7 細胞を 0.1%BSA を含む DMEM/F12 培地（フェノールレッド不含）または 0.1%BSA および 20 mM HEPES を含む 199 培地（フェノールレッド不含）にて血清飢餓条件においた。これらの細胞に刺激を加え、必要があれば引き続き阻害剤を添加してイメージングを行った。イメージングには倒立型顕微鏡 (IX71 または IX81 : Olympus, 東京, 日本) に以下の装備を施して用いた : 60 倍対物レンズ (Olympus)、冷却型 CCD カメラ (Cool SNAP-HQ または Cool SNAP-K4; Roper Scientific)、LED 照明システム (CoolLED precisExcite; Molecular Device)、IX2-ZDC レーザー型自動焦点合わせシステム (Olympus)、および MD-XY30100T-メタ電動 XY ステージ (SIGMA KOKI, 東京, 日本)。以下のフィルターセットを Omega Optical (Brattleboro, VT) より購入し、FRET および CFP 画像取得に用いた : XF1071 (440AF21) 励起用フィルター、XF2034 (455DRLP) ダイクロイックミラー、および蛍光フィルター 2 種 (XF3075 (480AF30) : CFP 用) および XF3079 (535AF26) : YFP 用)。バックグラウンドの除去および、FRET/CFP 比を示す IMD (intensity modulated display) モード画像を MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) を用いて作成した。なお IMD モードでは色彩を赤から青にかけて 8 種類に分割して FRET/CFP 比を表示し、各色彩の強度により FRET チャンネルと CFP チャンネルの平均強度を表示している。

### 多穴プレートを用いた FRET イメージング

核内移行シグナルを有する ERK 活性センサーである EKAREV-nls を Yusa らの方法に準じて HeLa 細胞に安定発現させた<sup>15</sup>。得られた細胞を 96 穴ガラス底プレートに  $1.5 \times 10^4$  cells/well の密度で播種した。1 日後、細胞を 6 時間血清飢餓条件におき EGF 刺激および阻害剤処理を 15 分間行った。その後、96 穴プレートを倒立型顕微鏡で上記の方法に従って撮影した。ただし 60 倍油浸対物レンズではなく 20 倍ドライ対物レンズを用いて行った。またプレートの各ウェルごとに 1 箇所ずつポジションを設定し、FRET 画像および CFP 画像を取得した。

### 共焦点顕微鏡によるスペクトル計測

トランスフェクションから 24 時間後に FRET バイオセンサーを発現する HeLa 細胞を 3-6 時間血清飢餓におき、スペクトルの計測を行った。計測には FV-1000 共焦点イメージングシステム (Olympus) の分光スキャンモードを用い、405 nm の励起光で CFP を励起して取得した。

### Eevee バックボーンシステムの数値モデリング

蛍光タンパク間の解離定数およびリンカーの長さが 1 分子型 FRET バイオセンサーに与える影響を調べる目的で、セリン・スレオニンキナーゼ活性を可視化する FRET バイオセンサー

に関する数理モデルを構築した (図 7A)。この数理モデルではバイオセンサーが以下の 3 つの状態をとると仮定した：脱リン酸化・開状態、リン酸化・開状態、およびリン酸化・閉状態。バイオセンサーはリン酸化・閉状態をとることで FRET 効率が上昇する。これら 3 つの各分子種の濃度を  $[np-open]$ 、 $[p-open]$ 、 $[FRET]$  にてそれぞれ表現する。また各状態間の遷移は以下の常微分方程式で記述されるリン酸化/脱リン酸化 ( $k_{phos}/k_{dephos}$ ) および結合/解離 ( $k_{close}/k_{open}$ ) 反応によってなされると仮定する。

$$\frac{d}{dt}[np-open] = -k_{phos}[np-open] + k_{dephos}[p-open]$$

$$\frac{d}{dt}[p-open] = k_{phos}[np-open] - (k_{dephos} + k_{close})[p-open] + k_{open}[FRET]$$

$$\frac{d}{dt}[FRET] = k_{close}[p-open] - k_{open}[FRET]$$

定常状態における 3 分子種の濃度は以下の式により与えられる。

$$[np-open] = \frac{k_{dephos}k_{open}}{k_{dephos}k_{open} + k_{close}k_{phos} + k_{open}k_{phos}}$$

$$[p-open] = \frac{k_{open}k_{phos}}{k_{dephos}k_{open} + k_{close}k_{phos} + k_{open}k_{phos}}$$

$$[FRET] = \frac{k_{close}k_{phos}}{k_{dephos}k_{open} + k_{close}k_{phos} + k_{open}k_{phos}}$$

ここで、 $[np-open] + [p-open] + [FRET] = 1$  と仮定している。これにより、FRET 効率( $FRET_e$ )は、

$$FRET_e = \frac{[FRET]}{[np-open] + [p-open] + [FRET]} = [FRET]$$

となる。続いて、1 分子型 FRET バイオセンサーでの FRET 効率を示す FRET/CFP 比を数理モデル上でも考慮するため、当研究室で用いている顕微鏡および撮影条件を元に以下の定式化を行った。まず FRET チャンネルからの蛍光強度 ( $FRET_i$ ) には FRET 効率に加えて CFP 蛍光 ( $CFP_i$ ) の FRET チャンネルへのもれこみの成分 (ブリードスルー) が含まれるとした。440 nm の波長で励起した際

に生じる YFP 蛍光の成分 (クロスエキサイテーション) はごくわずかで無視できるとした。次に FRET バイオセンサーの蛍光スペクトル (図 6) より CFP の明るさは YFP の明るさと同等とした。

これらにより、CFP チャネルおよび FRET チャネルから検出される蛍光強度 ( $CFP_i$  および  $FRET_i$ ) は、

$$CFP_i = (1 - FRET_e)$$

$$FRET_i = BT(1 - FRET_e) + QE \cdot FRET_e$$

ここで、 $BT$  と  $QE$  はブリードスルーおよび YFP の量子効率 ( $0 < BT < 1$ ,  $0 < QE < 1$ ) をそれぞれ示している。以上により、*in silico* における FRET/CFP 比 は下のよう書きける。

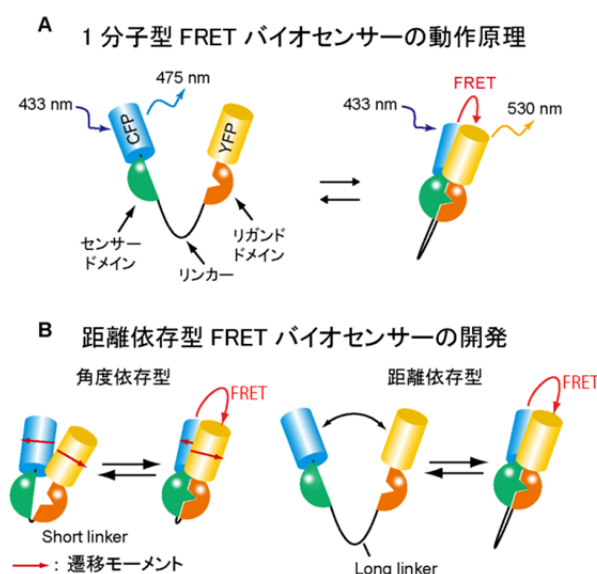
$$\frac{FRET_i}{CFP_i} = \frac{BT \cdot k_{open}(k_{dephos} + k_{phos}) + QE \cdot k_{close} k_{phos}}{k_{open}(k_{dephos} + k_{phos})}$$

上モデルを用いて数値計算をするにあたり、 $k_{phos}$ ,  $k_{dephos}$ ,  $k_{close}$  および  $k_{open}$  の初期値は全て 1 とした。本研究室の実験条件ではブリードスルー ( $BT$ ) はおよそ 0.5 である。黄色蛍光タンパク質の量子効率は全て Venus と同一とし、約 0.6 とした。最後に FRET/CFP 比を Mathematica software (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL) を用いて計算した。

## 結果

### 1 分子型 FRET バイオセンサーの合理的な設計戦略.

1 分子型 FRET バイオセンサーの開発を簡便化するために、本研究では種々のシグナル伝達分子に共通して利用できる FRET バイオセンサーのバックボーンを試みた。本研究では 1 分子型 FRET バイオセンサーとして、センサードメインおよびリガンドドメインをリンカーで結合し、さらに C 末端にドナーとしてシアン色蛍光タンパク質、N 末端にアクセプターとして黄色蛍光タンパク質を結合させたタンパク (図 2A)、およびそれをコードする DNA コンストラクト (図 2C) を開発することとした。センサードメインはモニターすべきシグナルを認識することでその構造が変化する部位を指す。構造変化をおこしたセンサードメインがリガンドドメインと相互作用することでバイオセンサー全体の立体構造が変化し、結果としてドナーからアクセプターに対する FRET 効率が増加 (場合により減少) する。

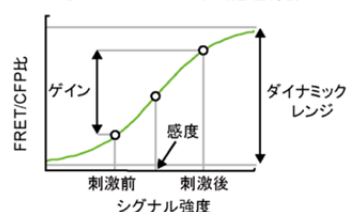


**戦略：完全 “距離依存型” の 1 分子型 FRET バイオセンサーの作製とその最適化**

### C 距離依存型 FRET バイオセンサーの 1 次構造



### D FRET バイオセンサーの性能を規定する要素



### 図 2. 1 分子型 FRET バイオセンサーの共通バックボーン

(A) 1 分子型 FRET バイオセンサーの動作原理および各ドメインの名称。

(B) 角度依存型 (左) および距離依存型 (右) の 1 分子型 FRET バイオセンサーの動作原理。

(C) 1 分子型 FRET バイオセンサーをコードする DNA の配列特徴図。バイオセンサー構築の際は図中に示す制限酵素サイトを用いることで各ドメインをコードする cDNA を交換した。

(D) 1 分子型 FRET バイオセンサーの、シグナル強度 (入力) に対する FRET/CFP 比 (出力) の応答曲線。ダイナミックレンジ、ゲイン、および感度を本図のように定義する (結果を参照のこと)。

序論でも述べた通り、1 分子型 FRET バイオセンサーの FRET 効率は主にドナーとアクセプター間の距離および両者の相対的配向（角度）に依存する<sup>2</sup>。センサードメインおよびリガンドドメインの微小な構造変化を検出する、すなわち高感度バイオセンサーを構築するためにはドナー・アクセプター間の角度変化を利用する方が、都合がよいと考えられる。実際、これまでに設計された多くの 1 分子型 FRET バイオセンサーはセンサードメインとリガンドドメインを短いリンカーでつないだ”角度依存型”であると考えられる。このように角度依存型 FRET バイオセンサーは”距離依存型”に比べて高感度であると考えられるものの<sup>1</sup>、FRET バイオセンサーを最適化する際にドナーとアクセプターのなす角度を予測し、これらを任意の配置におくことは極めて困難であった。これは FRET バイオセンサーのセンサードメインがリガンドドメインと結合している状態（”ON”状態）および結合していない状態（”OFF”状態）における立体構造が明らかになっていないことに起因する。以上をふまえ、本研究では角度依存的な FRET 効率の変化を可能な限り排除し、距離依存的な FRET 効率の変化のみおこす 1 分子型 FRET バイオセンサーを設計する、という目標を設定した。この目標達成のためセンサードメインとリガンドドメインの間に柔軟かつ長いリンカーを導入することとした（図 2B）。

続いて FRET バイオセンサーの評価を行うに先立ち、バイオセンサーの性能を規定する用語を本項にて先に定義することとする。現在の FRET バイオセンサーはほとんどが CFP および YFP 変異体をそれぞれ FRET ドナーおよびアクセプターとして利用しており、本研究でも CFP と YFP をそれぞれ標準のドナーおよびアクセプターとして記述する。また FRET はレシオメトリ法により検出されるものとする<sup>1</sup>。すなわち細胞を 440 nm の波長で励起し、その際の YFP チャネル（FRET）の蛍光強度と CFP チャネル（CFP）の蛍光強度の比、すなわち FRET/CFP 比をもって FRET 効率の程度を示すものとする。続いて、バイオセンサーの”ダイナミックレンジ”を全てのバイオセンサーが ON 状態の時の FRET/CFP 比と値と全てのバイオセンサーが OFF 状態のときの FRET/CFP 比の値の差、と定義する（図 2D）。生理的な条件ではこのダイナミックレンジは通常は測定できない。刺激前後の目的の分子活性の変化、あるいは濃度変化に対応した FRET/CFP 比の変化が実際に測定される値となる。ここで、刺激後の FRET/CFP 比と刺激前の FRET/CFP 比との差分を”ゲイン”と定義し、FRET バイオセンサーの性能評価に用いた。従って、ある細胞における FRET バイオセンサーのゲインは 2 つのパラメータ - FRET バイオセンサーのダイナミックレンジおよび刺激前に対する刺激後の ON 状態のバイオセンサーの増加分 - に依存する（図 2D）。最後に FRET バイオセンサーの目的とする刺激への”感度”をゲインの半分の FRET/CFP を与える刺激濃度（EC50 値）によって定義する（図 2D）。

### FRET ドナー/アクセプターペアの最適化

距離依存型の 1 分子型 FRET バイオセンサーを構築するにあたり、はじめにドナー/アクセプター蛍光タンパク質の最適化を行った。最適化に用いた試験型バイオセンサーとして既存の PKA 活性センサーである AKAR3<sup>17</sup> を原型とし、それに改変を加える事で最適化を行った。AKAR3 は PKA 基質のコンセンサス配列<sup>28</sup> およびリン酸化ペプチド結合ドメインである FHA1



ドメインを含んでいる (図 3A)。リンカーとして、まず 72 アミノ酸長のポリグリシンから成るリンカーを用いた。これは既存の ERK 活性センサーである EKAR<sup>16</sup>にて使用されているリンカーである。ドナー蛍光タンパクとして、群青色蛍光タンパク(mTFP1)およびシアン色蛍光タンパク(CFP)の変異体である、ECFP, Turquoise, CyPet を検討に用いた。さらにアクセプター蛍光タンパクとして Venus, 円順列変異型 Venus, mCitrine, および YPet といった黄色蛍光タンパク(YFP)の変異体を検討に用いた。なお、用いた蛍光タンパクに含まれる変異を方法の章の表 1 に示している。バイオセンサーのゲインは HeLa 細胞に試験型 PKA バイオセンサーを発現させた後、発現細胞に膜透過型 cAMP 誘導体である dibutyl cAMP (dbcAMP) を添加した前後の FRET/CFP 比をもとに計測した。CFP および YFP 変異体を種々の組み合わせで試したところ、cp50Venus をアクセプターとして使用した時以外の全ての場合において、FRET/CFP 比は dbcAMP 刺激により上昇した。それらの中でも ECFP/YPet (図 3B)、および Turquoise-GL/YPet を用いたバイオセンサーは 20%以上のゲインを示した。一方、CyPet/YPet ペアを用いたバイオセンサーは細胞内にて切断を受けたため、CyPet/YPet ペアは以降の検討からは除外した。この切断の分子機構は今のところ不明である (図 4)。次に、ERK 活性センサーである EKAR を用いて同様の検討を行った。YPet およびサンゴ由来の蛍光タンパクである mTFP1<sup>3</sup> ペアをアクセプター/ドナーペアとして用いると、Venus/mTFP1 ペアを用いた場合と比べて FRET/CFP 比の上昇を示さなかった (図 3B および 3C)。このことから 2 量体を形成しやすい蛍光タンパク質のペアが距離依存型 FRET バイオセンサーのドナー・アクセプターペアに適することが示唆される (考察の章を参照)。以上を踏まえ、ECFP/YPet もしくは Turquoise-GL/YPet が距離依存型 1 分子型 FRET バイオセンサーのドナー/アクセプターに適すると結論した。

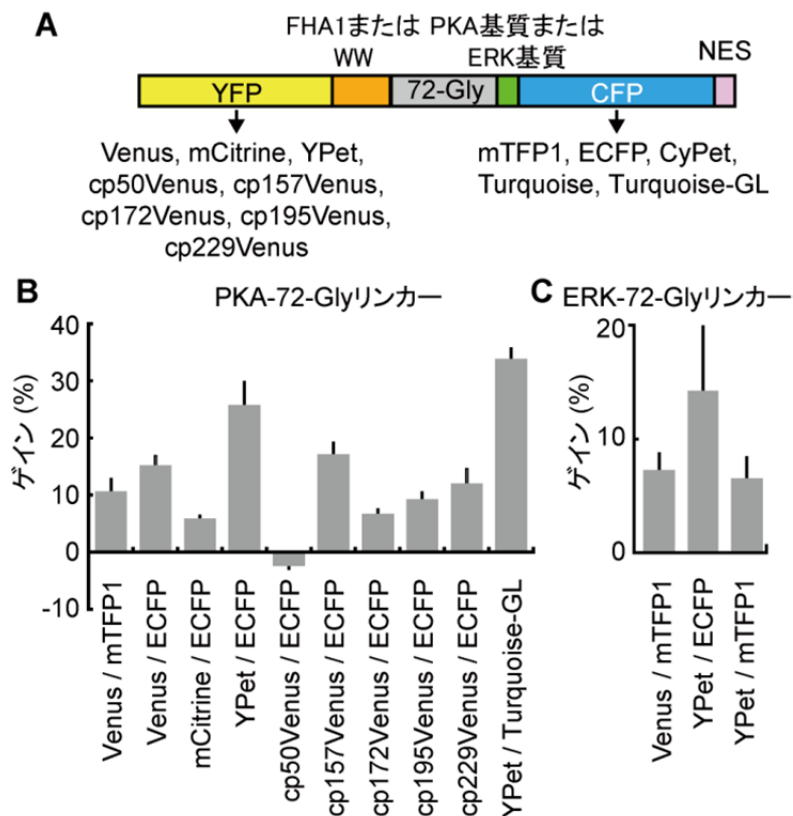


図 3. 距離依存型 FRET バイオセンサーにおける蛍光タンパクペアの最適化

(A) 検討に用いた PKA 活性センサーおよび ERK 活性センサーの 1 次構造。N 末端側より YFP (アクセプター)、リガンドドメイン、72-Gly リンカー、基質配列 (センサードメイン)、CFP (ドナー) および核外移行シグナル (NES) で構成される。リガンドドメインとセンサードメインは PKA 活性センサーの場合には FHA1 および PKA 基質、ERK 活性センサーの場合には WW および ERK 基質を用いた。用いた PKA 基質および ERK 基質の配列は表 2 に示した。

(B) 図 A の”YFP”および”CFP”下に示した種々の蛍光タンパクペアを有する PKA 活性センサーを HeLa 細胞に発現させ、1 mM dbcAMP で 10 分間刺激した際の FRET/CFP 比のゲインの平均値。エラーバーは標準偏差を示す ( $n > 5$  細胞)。

(C) 種々の蛍光タンパクペアを有する ERK 活性センサーを HeLa 細胞に発現させ、10 ng/ml EGF で 10 分間刺激した際の FRET/CFP 比のゲインの平均値。エラーバーは標準偏差を示す ( $n > 5$  細胞)。

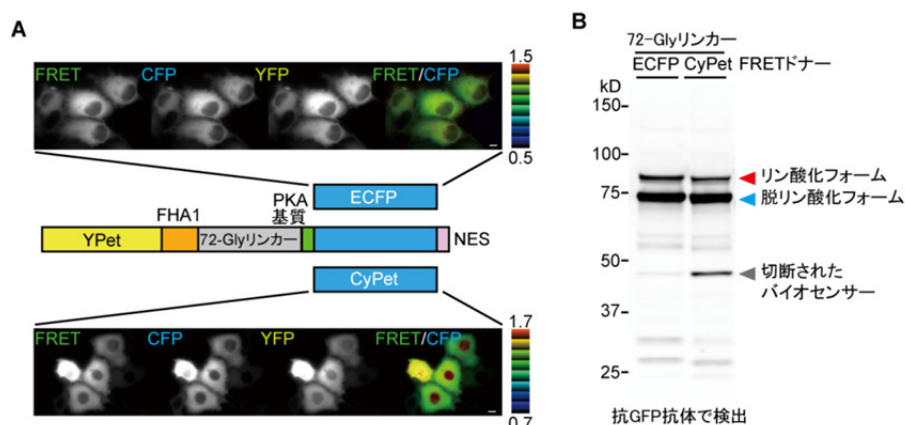


図 4. YPet/CyPet FRET アクセプター/ドナーペアをもつ PKA 活性 FRET バイオセンサーは細胞内にて切断を受ける。(A) ECFP/YPet ペアもしくは CyPet/YPet ペアを持つ PKA 活性 FRET バイオセンサーを発現する HeLa 細胞を FRET, CFP, および YFP 用のフィルターセットを用いて撮影した結果。FRET/CFP レシオ画像是 IMD (intensity modulated display) モードにて表示している。スケールバーは 10  $\mu$ m. YPet/CyPet ペアを含む PKA 活性センサーは核内において高い YFP 蛍光強度および高い FRET/CFP 比を示している。(B) PKA 活性センサーを発現する HeLa 細胞を 3 時間血清飢餓下においた後、抗 GFP 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果。CyPet をドナーとして含むバイオセンサーを用いたレーンのみ、切断によって生じた断片が生じている。

## リンカー長さの最適化

当研究室では Ras 活性 FRET バイオセンサーである Raichu-Ras について、センサー内の Ras の基底状態（無刺激下）における GTP/GDP 結合比が内在性 Ras のそれと比べて高いことを報告している。これは、Raichu-Ras では ON 状態のバイオセンサーの割合が内在性 Ras の GTP/GDP 結合比から予想される割合と比べて多いことを示唆する<sup>21</sup>。この原因としてリガンドドメインである RafRBD がセンサードメインである GTP 結合型 Ras (Ras-GTP) に結合することで Ras を遮蔽し、Ras GTP 加水分解促進タンパク (RasGAP) のアクセスを阻害している可能性が考えられる。これを踏まえると、リンカーの長さを長くすることでセンサードメインとリガンドドメインとの相互作用を減少させ、FRET バイオセンサーの ON 状態を減少させればバイオセンサーのゲインを高めることが可能と思われた。そこで (SAGG)<sub>n</sub> リンカー (n = 13-61)<sup>20</sup> を作製し、それらを試験型 PKA 活性センサーに導入することでリンカー長さがゲインに与える影響を検証した。予想通り、無刺激時における FRET/CFP 比はリンカーの長さに逆比例した (図 5B)。バイオセンサーの蛍光スペクトルを取得したところ、YFP のピーク (525 nm 付近) と CFP のピ

ーク (475 nm 付近) のピーク比がリンカーの長さによって減少していることから、長いリンカーを用いると無刺激状態で FRET が起きにくくなっていることが明らかとなった (図 6)。dbcAMP 刺激時における FRET バイオセンサーのゲインはリンカー長さに応じて上昇したが、これは dbcAMP 無添加時における FRET/CFP 比の減少によるものと考えられた (図 5C)。

ここで観察された刺激前状態における FRET/CFP 比の減少を説明するにあたり 2 つの可能性が考えられる。1 つ目は、ロングリンカーが OFF 状態における CFP と YFP の距離を増加させることで FRET 効率を減少させる、という可能性である。2 つ目は、ロングリンカーが基底状態における ON 状態のバイオセンサーの割合を減少させる、という可能性である。基底状態の FRET/CFP 比の減少がどちらの可能性によるものかを明らかにするため、リン酸化状態の FRET バイオセンサーと脱リン酸化状態のバイオセンサーを生化学的に分離し、それぞれの存在比を定量することを試みた。そのためにリン酸化アミノ酸キレーターである Phos-tag<sup>25</sup> を含む SDS ポリアクリルアミドゲルを用いたウェスタンブロット解析を行った (図 5D)。52, 84, 116 aa リンカーに対して実験を行った結果、116 aa リンカーは他のリンカーよりも基底状態におけるリン酸化レベルを減少させた。dbcAMP 添加時におけるリン酸化レベルの減少は基底状態における減少分と比べ少なかったため、dbcAMP 有無におけるバイオセンサーのリン酸化レベルの差分が 116aa リンカーで大きくなった。その結果として 116 aa リンカーを用いた場合のゲインが短いリンカーを用いた場合よりも大きくなったと結論づけた (図 5D)。リン酸化状態のバイオセンサーはセリン・スレオニンホスファターゼ阻害剤である Calyculin A の添加により 3 種類のバイオセンサー間でほぼ同一となった。以上の結果よりロングリンカーは FRET バイオセンサーの基底状態における ON 状態の割合を減少させることでゲインを上昇させることが示された (図 5D)。

以上の検討により、我々はロングリンカーを適用すること、加えて距離依存型 FRET バイオセンサーに最適な蛍光タンパク質ペアを適用した 1 分子型 FRET バイオセンサーの共通バックボーンの候補を作製した。本研究では得られたバックボーンシステムをその効果に基づき、“Extension for enhanced visualization by evading extra-FRET (Eevee)”と命名した。さらに得られたロングリンカー (群) を EV リンカー (群) と命名した。なお、バイオセンサーのゲインは 116 aa にておよそ頂点に達したと判断し (図 5C)、以降の検討では 116 aa リンカーを用いることにした。

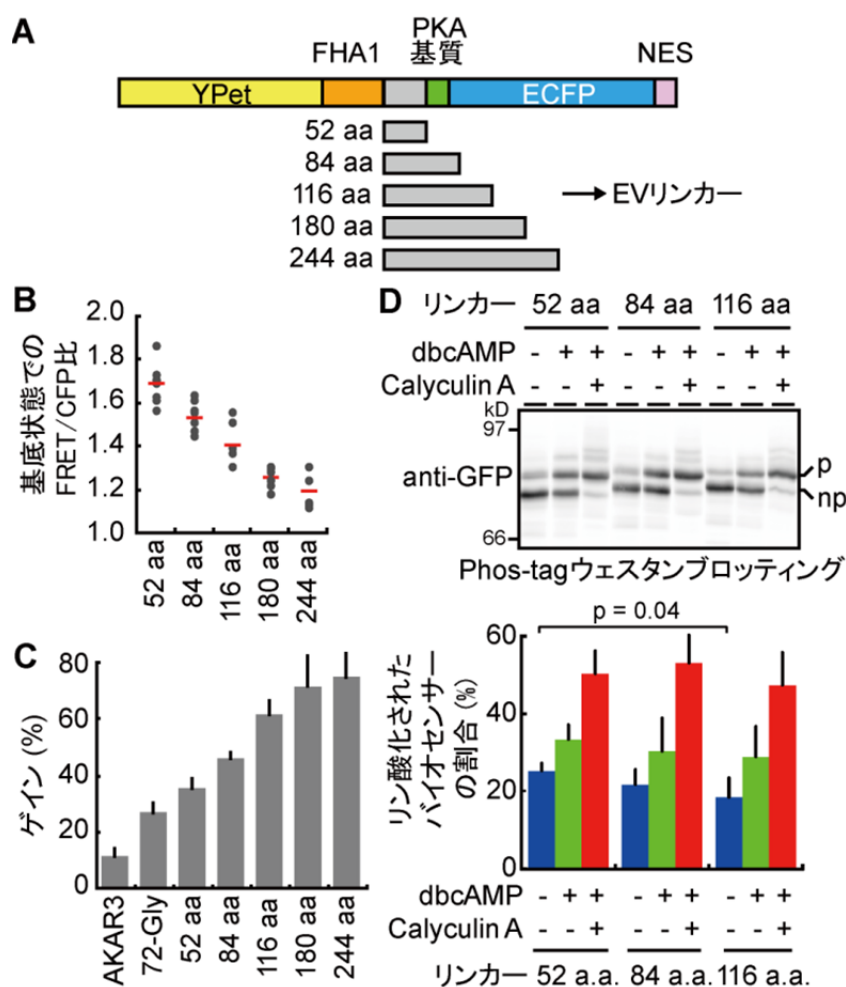


図 5. ロングリンカーが FRET バイオセンサーのゲインに与える影響

(A) YPet と ECFP および長さの異なるリンカーからなる PKA 活性センサーの模式図。(B) PKA 活性センサーのリンカー長さ変異体を HeLa 細胞に発現させ、基底状態における FRET/CFP 比を計測した結果。各点は個々の細胞が示す FRET/CFP 比と対応する ( $n > 5$ )。水平のバーで平均値を示す。(C) (A) の PKA 活性センサーを発現する HeLa 細胞を 1 mM dbcAMP で 10 分間刺激した後の FRET/CFP 比のゲインを示す。エラーバーは標準偏差を示す ( $n > 5$ )。(D) 52, 84, および 116 aa リンカーを有する PKA 活性センサーを HeLa 細胞に発現させ、1 mM dbcAMP もしくは 1 mM dbcAMP と 50 nM Calyculin A にて 10 分間刺激した。細胞溶解液を Phos-tag 含有 SDS-PAGE ゲルで展開、抗 GFP 抗体および蛍光標識 2 次抗体を用いたウェスタンブロットで解析した結果。リン酸化された分子種(p)および脱リン酸化された分子種(np)の位置をブロットの右横に示す。各バンドの蛍光強度を定量した結果をブロット下部の棒グラフにて示す。エラーバーは標準偏差を示す ( $n = 3$ )。

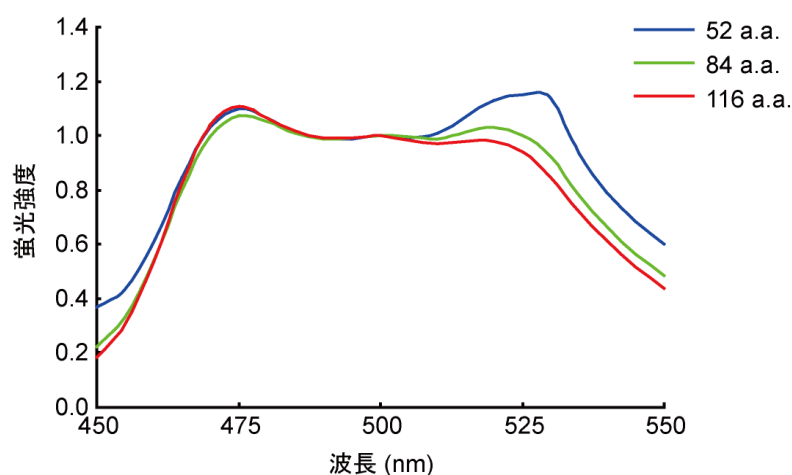


図6. PKA活性センサーの蛍光スペクトル

52 aa リンカー (青), 84 aa リンカー (緑), および 116 aa リンカー (赤)を有するPKA活性センサーを発現させたHeLa細胞を共焦点レーザー顕微鏡の分光スペクトルモードを用いて蛍光スペクトルを取得した結果。バイオセンサーごとに500 nmの蛍光強度を用いて蛍光スペクトルを正規化した。リンカーの長さに反比例してYFP蛍光スペクトルの極大値に対応する約525 nmの蛍光強度が減少している。

### Eevee バックボーンシステムの数理モデルとシミュレーションによる検証

作製した Eevee バックボーンの動作原理を考察するために、距離依存型の 1 分子型 FRET バイオセンサーに関する数理モデルを構築し、シミュレーションを行った。本数理モデルでは Eevee バックボーンにセンサードメインとして Ser/Thr キナーゼの基質、リガンドドメインとしてリン酸化ペプチド結合ドメイン (PBD) を用いた FRET バイオセンサーについて、非リン酸化・開状態 [np-open], リン酸化・開状態 [p-open], およびリン酸化・閉状態 [FRET] の 3 つの状態を仮定した (図 7A)。この 3 つの状態が定常状態では平衡に達すると仮定し、FRET/CFP 比を下記の式で表した (詳細は方法の章を参照)。

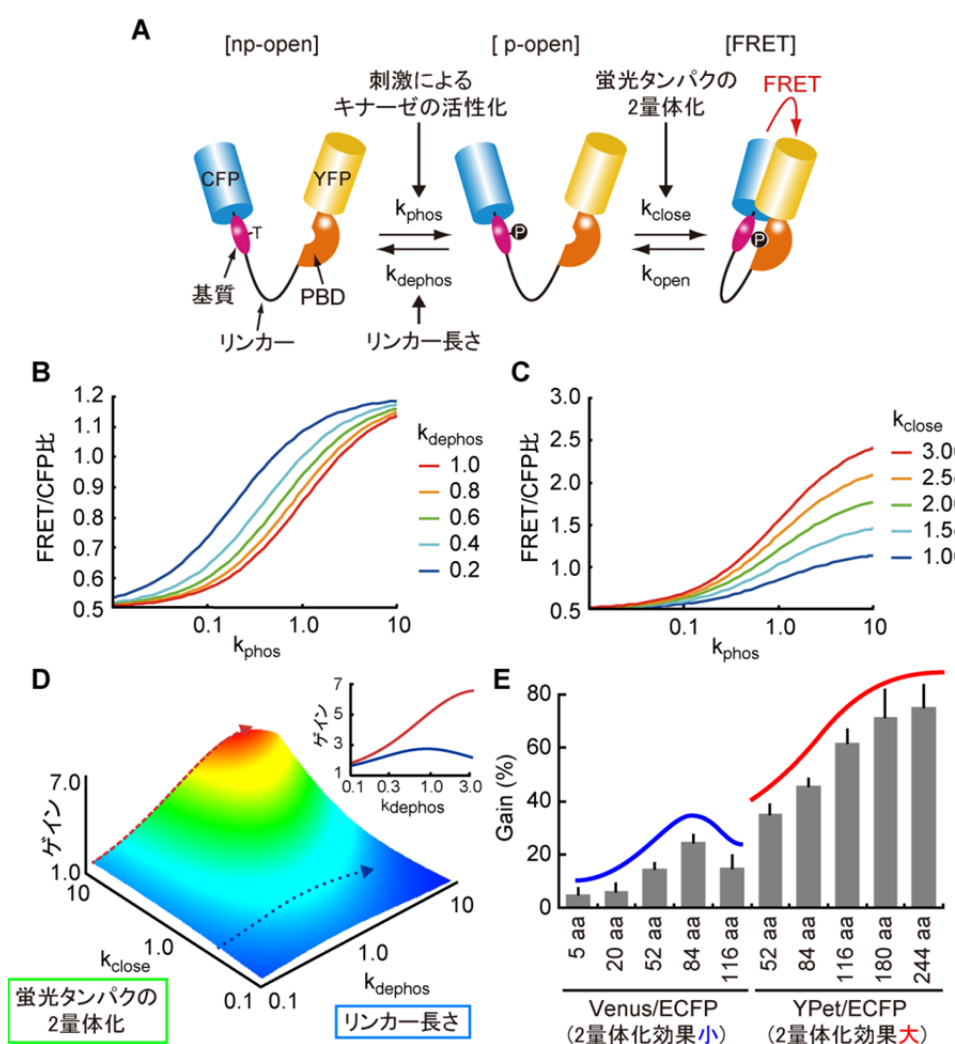
$$\frac{FRET_i}{CFP_i} = \frac{BT \cdot k_{open} (k_{dephos} + k_{phos}) + QE \cdot k_{close} k_{phos}}{k_{open} (k_{dephos} + k_{phos})}$$

ここで、 $k_{phos}$ ,  $k_{dephos}$ ,  $k_{close}$ , および  $k_{open}$  はリン酸化速度、脱リン酸化速度、プローブの開状態への遷移速度、およびプローブの閉状態への遷移速度をそれぞれ表す (図 7A)。 $BT$  はドナータンパク質蛍光のアクセプター蛍光チャンネルへのもれこみ (ブリードスルー) を表し、 $QE$  はアクセプタータンパク質の量子効率を表す。 $k_{phos}$  はキナーゼ活性の上昇により、具体的には細胞に dbcAMP や EGF 刺激を行うことにより増加するとした。続いてロングリンカーと蛍光タンパク間の 2 量体化効果がバイオセンサーのゲインに与える影響を検証するために図 3 および図 5 の結果を踏まえて、次の 2 つの仮定をおいた。1 つ目は、リンカーの長さを増やすことで  $k_{dephos}$  が増

加（脱リン酸化反応を促進）し、バイオセンサー基底状態におけるリン酸化レベルが下がる。その結果基底状態の FRET/CFP 比を減少させる、という仮定である。2 つ目は CFP および YFP 間のヘテロ 2 量体化の形成により  $k_{close}$  が増加し、その結果閉状態の FRET バイオセンサーの割合が増加することという仮定である。

まずシミュレーション上にて  $k_{dephos}$  と  $k_{close}$  の一方を固定し、もう一方を変化させることでロングリンカーによる脱リン酸化反応の促進と蛍光タンパク質の 2 量体化による閉化反応の促進が FRET バイオセンサーの FRET/CFP 比を上昇させるか検討した。その結果、リンカー長の増大すなわち  $k_{dephos}$  の増加により、グラフは右へシフトし、刺激 ( $k_{phos}$ ) に対する”感度”は低下することがわかった (図 2D および 図 7B)。一方、蛍光タンパク質間の 2 量体化効果 ( $k_{close}$ ) が増加すると、グラフは、Y 軸方向に拡大するので、FRET/CFP 比の”ダイナミックレンジ”が増加することが分かった (図 2D および 図 7C)。最後に  $k_{dephos}$  と  $k_{close}$  の 2 変数を同時に変化させた際のゲインの変化を計算した。すなわち刺激存在下 ( $k_{phos} = 1.0$ ) の FRET/CFP を刺激非存在下 ( $k_{phos} = 0.1$ ) の FRET/CFP で除算した値 (ゲイン) がどのような挙動を示すか検討した。 $k_{dephos}$  および  $k_{close}$  を様々に変化させて得たゲインをヒートマップで可視化したところ、ゲインは図中央を頂点とし図右下に向かって尾根を広げる山型の挙動を示した (図 7D)。このことは 2 量体化しやすい蛍光タンパク質を利用することでゲインは大きくなること、リンカー長さにはゲインを極大にする最適な長さが存在すること、そして、2 量体化しやすい蛍光タンパクと最適な長さのリンカーを組み合わせる事でゲインを最大にできることを示している。

次にこの数理モデルによるシミュレーション結果を実験的に検証することを試みた。すなわち Venus/ECFP もしくは YPet/ECFP をドナー・アクセプターとする、さまざまな長さのリンカーを含む PKA 活性センサーを構築し、それらの PKA 活性化時におけるゲインを比較した。すると Venus/ECFP 蛍光タンパク質ペアを用いた際にはリンカー長さが 84 aa の時にゲインが極大値をとった。これに対し、Venus/ECFP よりも 2 量体化しやすい蛍光タンパク質ペアである YPet/ECFP を用いた場合では、本実験で用いた範囲内ではリンカーは長いほどゲインが大きくなった (図 7E)。以上の結果は本研究で構築した 1 分子型 FRET バイオセンサーに関する数理モデルが実際のバイオセンサーの挙動を少なくとも図 7E で検討した範囲内ではよく説明していることを意味している。同時に Eevee バックボーンは距離依存型の 1 分子型 FRET バイオセンサーを合理的に設計する上で必要な要件をよく満たしていることも示している。



**図 7. Eevee バックボーンシステムの数理検証** (A)セリン・スレオニンキナーゼ活性を可視化する FRET バイオセンサー,Eevee の動作原理。  $k_{phos}$ ,  $k_{dephos}$ ,  $k_{close}$ ,および  $k_{open}$  はそれぞれリン酸化速度、脱リン酸化速度、バイオセンサーの閉じる速度、および開く速度を示す。PBD はリン酸化ペプチド結合ドメインを指す。(B)刺激強度( $k_{phos}$ )に対する FRET/CFP 比の応答曲線を右に示すリンカー長さ( $k_{dephos}$ )ごとにシミュレーションした結果。(C) 刺激強度 ( $k_{phos}$ )に対する FRET/CFP 比の応答曲線を右に示す蛍光タンパク質間の 2 量体化の強度( $k_{close}$ )ごとにシミュレーションした結果。(D)FRET バイオセンサーのゲイン、すなわち基底状態( $k_{phos} = 0.1$ )における FRET/CFP 比に対する刺激存在下( $k_{phos} = 1.0$ )における FRET/CFP 比の相対値を  $k_{dephos}$  と  $k_{close}$  の両変数を動かしながらシミュレーションした結果。右上の挿入図は  $k_{close} = 0.3$ (青)および  $k_{close} = 10$ (赤)に固定した際のリンカー長さ( $k_{dephos}$ )に対するゲインを示す。青線および赤線は(D)本図の青点線および赤点線にそれぞれ対応する。青線ではゲインの極大値が存在している。(E)リンカー長さおよび蛍光タンパク質の組をそれぞれ変えた PKA 活性センサーのゲイン。YPet/ECFP を含むセンサーのデータは図 5C のそれと同一である。Venus/ECFP ペアを用いた際はゲインの上昇に極大値が存在し、数理検証の結果と合致する。



## Eevee バックボーンに基づくキナーゼ活性 FRET バイオセンサーの構築

作製した Eevee バックボーンを用いることで、種々のシグナル伝達分子に対する 1 分子型 FRET バイオセンサーが実際に構築できるかどうかを検討するため、本バックボーンを既報のキナーゼ活性 FRET バイオセンサーに適用し、既報型との比較を行った。ここでは PKA 活性センサーである AKAR3<sup>17</sup>、ERK 活性センサーである EKAR<sup>16</sup>、および JNK 活性センサーである JNKAR1<sup>19</sup>を検討に用いた。各バイオセンサーで用いられている基質を Eevee バックボーンに導入し、得られた新型の PKA, ERK, JNK の活性センサーをそれぞれ AKAR3EV, EKAREV, JNKAR1EV と命名した。続いてこれら FRET バイオセンサーを HeLa 細胞に発現させ、図 8 に示した刺激を加えてタイムラプス FRET イメージングを行った。AKAR3EV のゲインはオリジナルの AKAR3 と比較して約 6 倍の向上が見られた (図 8A)。同様に EKAREV と JNKAR1EV のゲインはそれぞれのオリジナルのバイオセンサーと比べて 4 倍、および 10 倍の向上がみられた (図 8B,C)。また EKAREV に用いた基質配列、PDVPRTPVDKAKLSFQFP は FHA1 ドメインとの結合に必要な T.X.X.D (X:任意のアミノ酸) および WW ドメインとの結合に必要な S/T.P の配列を有している。WW ドメインを FHA1 ドメインに交換したところ、EKAREV の EGF 刺激時におけるゲインは同程度であった (データ無し)。このことから WW, FHA1 の両方がリン酸化ペプチド結合ドメインとして利用可能であることが示唆される。

加えて Eevee バックボーンは EGFR および Abl の活性センサーである Picchu<sup>29</sup>にも適用可能であった。EV リンカーを持つ Picchu においては、リガンドドメインとしてヒト CrkII の SH2-SH3 領域を用い、センサードメインとしてヒト CrkII の一部 (アミノ残基 217-225) を用いた。作製した PicchuEV は EGF 刺激下の HeLa 細胞にて従来型 Picchu と比べて 2 倍大きいゲインを示した (図 8D)。さらに PicchuEV と Picchu では FRET/CFP 比の経時変化にほとんど違いが見受けられなかった (図 8D)。このことは PicchuEV が従来型 Picchu 同様にチロシンキナーゼとチロシンホスファターゼのすばやい活性変化をモニターできることを示している。

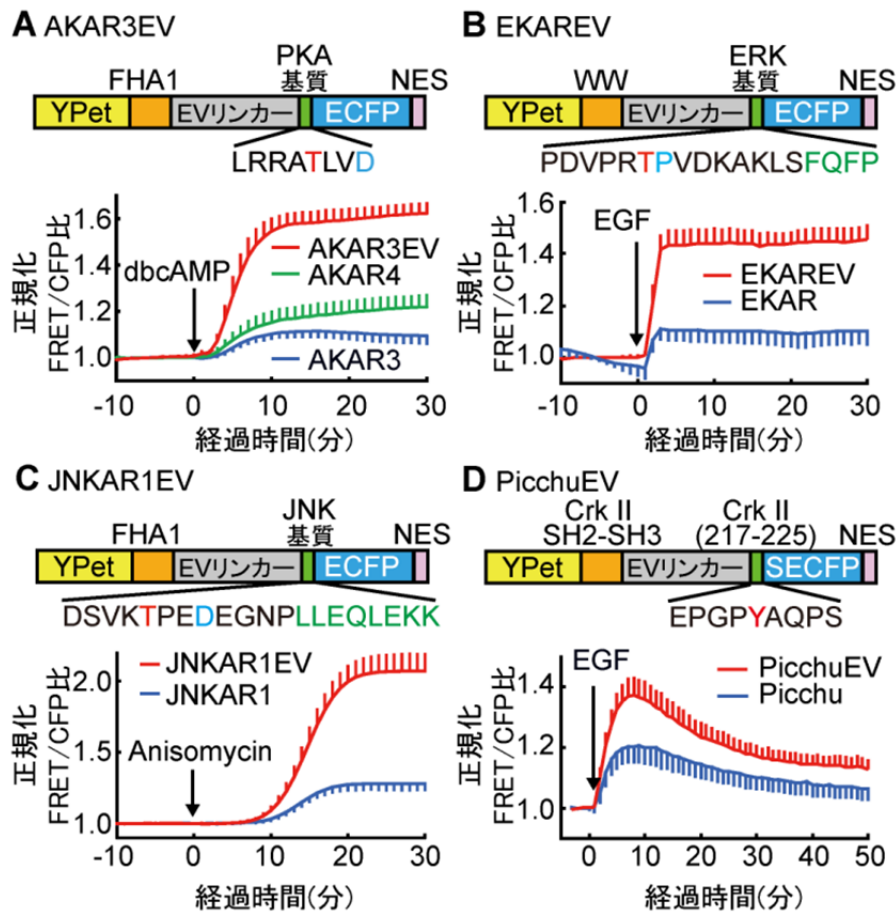


図 8. Eevee バックボーンを用いた FRET バイオセンサーの改良

各パネルの上側に Eevee バックボーンに基づく新型バイオセンサーの構造を示している。基質配列の赤文字はリン酸化を受けるサイト、青文字は FHA1 もしくは WW ドメインとの結合を促進するために導入した 1 アミノ酸置換、緑文字はキナーゼとのドッキングドメインをそれぞれ示している。(A) AKAR3EV、AKAR3 または AKAR4 を発現する HeLa 細胞を 1 mM dbcAMP で刺激し FRET/CFP 比の経時変化をプロットした。各細胞の FRET/CFP 比は刺激前の FRET/CFP 比により正規化した。少なくとも 10 細胞から FRET/CFP 比を定量し、その平均値および標準偏差を時間に対してプロットしている。(B) EKAREV または EKAR を発現する HeLa 細胞を 10 ng/ml EGF にて刺激した結果。(C) JNKAR1EV または JNKAR1 を発現する HeLa 細胞を 1  $\mu$ g/ml Anisomycin にて刺激した結果。(D) EGFR/Abl 活性センサーである PicchuEV または Picchu を発現する HeLa 細胞を 25 ng/ml EGF にて刺激した結果。

### **Eevee バックボーンに基づく低分子量 G タンパク質の FRET バイオセンサー**

キナーゼに続き、低分子量 G タンパク質の FRET バイオセンサーに対しても Eevee バックボーンが適用可能か検討した。当研究室にて以前作製した Ras と Rac1 のバイオセンサーである Raichu-Ras<sup>21</sup> および Raichu-Rac1<sup>22</sup> について Eevee バックボーンを適用することで RaichuEV-Ras および RaichuEV-Rac1 を構築した。EGF 刺激下における Cos-7 細胞でのゲインを比較したところ、RaichuEV-Ras および RaichuEV-Rac1 はそれぞれの従来型と比較して 2 倍、および 3 倍のゲインの向上を示した (図 9B および E)。また AKAR3EV の場合と同様に (図 5C)、Raichu-Ras の基底状態における FRET/CFP 比は EV リンカーの導入により減少した (図 9C)。同様に RaichuEV-Rac1 の基底状態における FRET/CFP 比も従来型の Raichu-Rac1 と比べて大きく減少した (図 9F)。加えて、RaichuEV または Raichu を発現する Cos-7 細胞を <sup>32</sup>P 正リン酸により代謝標識し、Raichu に結合している GTP および GDP の存在比を定量したところ、RaichuEV-Ras および RaichuEV-Rac1 の両方が従来型よりも低い GTP 結合比を示した (図 10)。このことから、EV リンカーによる Raichu のゲイン上昇は AKAR3EV の場合同様、EV リンカーによって Raichu 内の低分子量 G タンパク質への GAP のアクセスが高まり、基底状態における GTP 結合型の Raichu が減少した結果、ゲインが上昇したと考えられる。

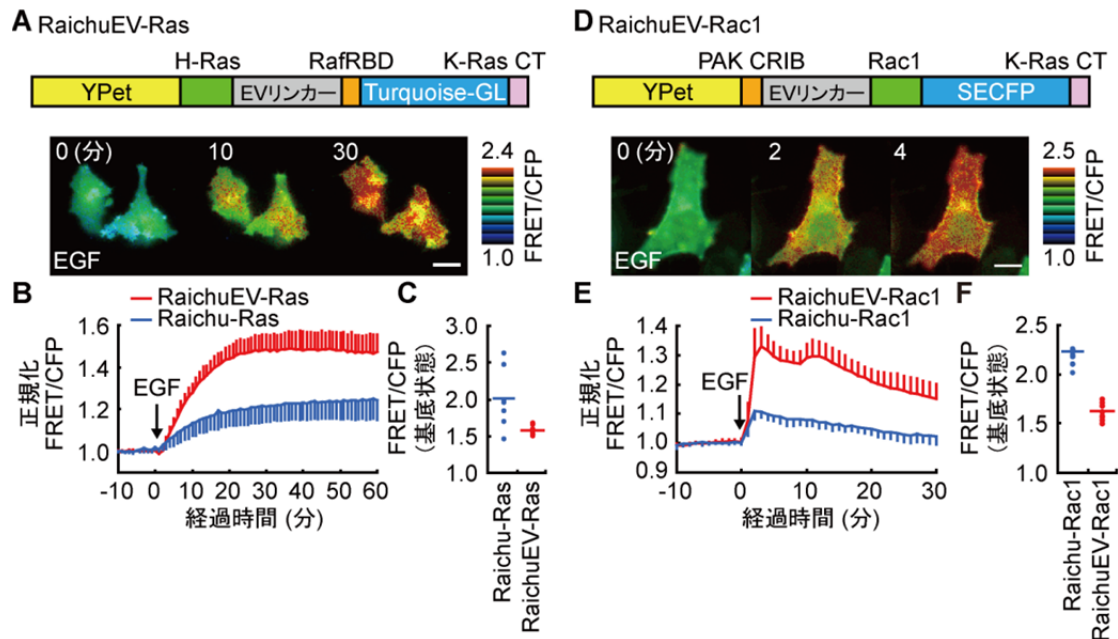


図 9. Eevee バックボーンに基づく低分子量 G タンパク質の FRET バイオセンサー

Eevee バックボーンを用いた FRET バイオセンサーである RaichuEV の構造を(A)図および(D)図の上側に示す。RafRBD および PAK CRIB ドメインはそれぞれ Raf1 の Ras 結合ドメインおよび Cdc42/Rac-相互作用結合ドメイン(Cdc42/Rac- interactive binding domain)を表す。RaichuEV もしくは従来型を発現する Cos-7 細胞を 50 ng/ml EGF で刺激しタイムラプス FRET イメージングを行った。代表的な FRET/CFP 比画像を IMD モードにて示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B, E)個々の細胞の FRET/CFP 比を刺激前の値で正規化したもの。少なくとも 10 細胞の平均値および標準偏差を時間に対してプロットした。(C, F) RaichuEV および Raichu の基底状態における FRET/CFP 比。各点は単一細胞が示す値に対応し、少なくとも 6 細胞に対して解析を行った。バーは平均値を示す。

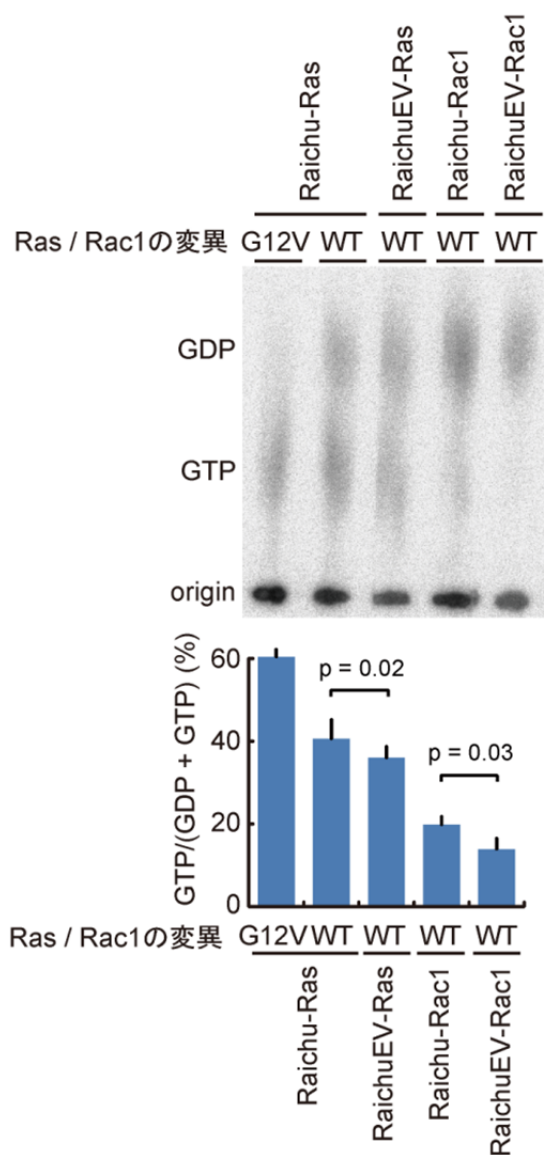


図 10. EV リンカーによる Raichu バイオセンサーの GTP 結合比の減少

Raichu または RaichuEV を Cos-7 細胞に発現させたのち、 $^{32}\text{P}$ i により標識した。Raichu に結合している GTP および GDP を薄層クロマトグラフィーにより展開し、BAS-1000 イメージアナライザーを用いて定量した。下棒グラフは 4 回の独立した実験結果の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。また、p 値は一对の標本に対する片側 t 検定により求めた。

EV リンカーの導入により、Raichu-Ras および Raichu-Rac1 の GTP 結合比が減少している。

## Eevee バックボーンを用いた新規 FRET バイオセンサーの簡便な開発

次に Eevee バックボーンを用いて RSK, S6K, Akt, および PKC に対する新型のセリン・スレオニンキナーゼ活性センサーの作製を試みた (図 11 および図 12)。これらの作製にあたり、目的キナーゼに特異的で、かつリン酸化ペプチド結合ドメインと結合し得る基質配列を既報およびデータベース内の検索により選別した。具体的には TSC2 の Ser1798<sup>30</sup> および Rictor の Thr1135<sup>31</sup> を Eevee-RSK および Eevee-S6K の基質ペプチドとしてそれぞれ採用した。これらの FRET バイオセンサーを発現する HeLa 細胞を EGF にて刺激し、RSK 活性センサーの場合は 10 分後に RSK 阻害剤である BI-D1870 を、S6K 活性センサーの場合は 30 分後に S6K 上流のキナーゼである mTORC1 の阻害剤である Rapamycin を添加した (図 11A-F)。EGF 刺激により、RSK 活性センサーおよび S6K 活性センサーは刺激依存的な FRET/CFP 比の上昇を示した。また阻害剤添加による FRET/CFP 比の減少も観察された。この結果により、Eevee バックボーンが FRET バイオセンサー開発の迅速かつ容易な手法を提供しうることが示された。

同様に、既報の Akt リン酸化コンセンサス配列<sup>32,33</sup> を Eevee バックボーンへ導入することで Akt 活性センサーを構築し、MARCKS の Ser159 を含む配列を用いて PKC 活性センサーを作製した。刺激依存的な FRET 効率の変化がみられるか検討したところ、Akt 活性センサーのゲインは EGF 刺激下の Cos-7 細胞で 8%、PKC 活性センサーのゲインは TPA 刺激下の HeLa 細胞で 3%であった (図 12E および N)。特に PKC 活性センサーのゲインは他の Eevee 型センサーのゲインと比較して低い値であった。ゲインが低い理由として、バイオセンサー内の基質が受けるリン酸化量が少ないことが考えられた。そこで基質のリン酸化レベルを増加させることでゲインを高めることを考え、Akt 活性センサーの場合はバイオセンサー N 末端にヒト Akt1 の PH ドメインを導入した (図 12A)。PH ドメインはホスファチジルイノシトール (3,4,5)-三リン酸 (PIP<sub>3</sub>) と結合する性質があり、これを利用してバイオセンサーを Akt 近傍に移行させるシグナルとして用いた。この AktPH ドメインを結合した Akt 活性センサー (以下 Eevee-Akt と記す) を Cos-7 細胞に発現させ EGF 刺激を行ったところ、予想通り形質膜近傍にて FRET/CFP 比の上昇を示した (図 12C)。同様に PKC 活性センサーの N 末端にヒト PKCβ の C1 ドメインを結合することで Eevee-PKC を作製した (図 12J)。C1 ドメインはジアシルグリセロール (DAG) と結合するため、形質膜移行シグナルとして利用している。Eevee-Akt の場合同様に、Eevee-PKC を HeLa 細胞に発現させ TPA 刺激を行ったところ、形質膜近傍にて急速かつ有意な FRET/CFP 比の上昇が観察された (図 12K)。しかしながら、リン酸化をうけるスレオニンをアラニンに置換した TA 変異型の Eevee-Akt および Eevee-PKC でも刺激依存的な FRET/CFP 比の上昇が観察された (図 12B,K,S および T)。このことは Eevee-Akt および Eevee-PKC ではゲインへのリン酸化非依存的な効果による影響が無視できないほど大きいことを意味している。同時に AktPH ドメインや C1 ドメインによるバイオセンサーの形質膜移行は基質のリン酸化量を増大させる目的には不十分であることも同時に意味する。ただし、Eevee-PKC にてバイオセンサーを K-Ras C 末端のファルネシル化配列で形質膜に局在させた場合は TPA 刺激により 8%のゲインが得られた (図 12Q)。細胞質型ではゲインが 3%であったことを踏まえるとバイオセンサーをキナーゼ近傍に

局在させる戦略それ自体は有効であると考えられる。以上の結果はキナーゼ活性センサーに用いる基質の選択が特異性の高い、かつゲインの大きなバイオセンサーを構築する上で極めて重要であることを示唆している。

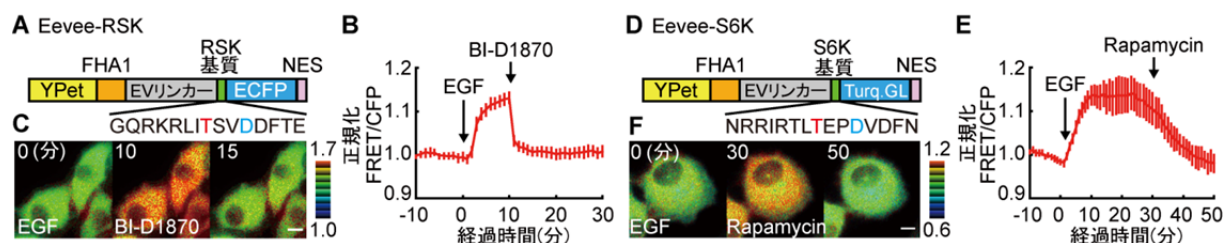


図 11. Eevee バックボーンに基づく新規 RSK FRET バイオセンサーおよび S6K FRET バイオセンサー

(A および D) RSK 活性モニター、Eevee-RSK および S6K 活性モニター、Eevee-S6K の 1 次構造。赤文字はリン酸化をうけるサイト、青文字は FHA1 ドメインとの結合を促進するためのアミノ酸 1 置換を示す。(B および E) Eevee-RSK を発現する HeLa 細胞(B)、および Eevee-S6K (E)を発現する HeLa 細胞をそれぞれ 10 ng/ml EGF で刺激し、タイムラプス FRET イメージングを行った結果。さらに 10  $\mu$ M BI-D1870 (B)または 100 nM Rapamycin (E)を刺激以降に図中に示す時点にて添加した。各細胞の FRET/CFP 比を刺激前の FRET/CFP 比の平均値にて正規化し、少なくとも 10 細胞を解析した平均値および標準偏差を経時変化と共に示す。(C および F) 代表的な FRET/CFP レシオ画像。IMD モードにて FRET/CFP 比および蛍光強度を示している。スケールバーは 10  $\mu$ m を示す。



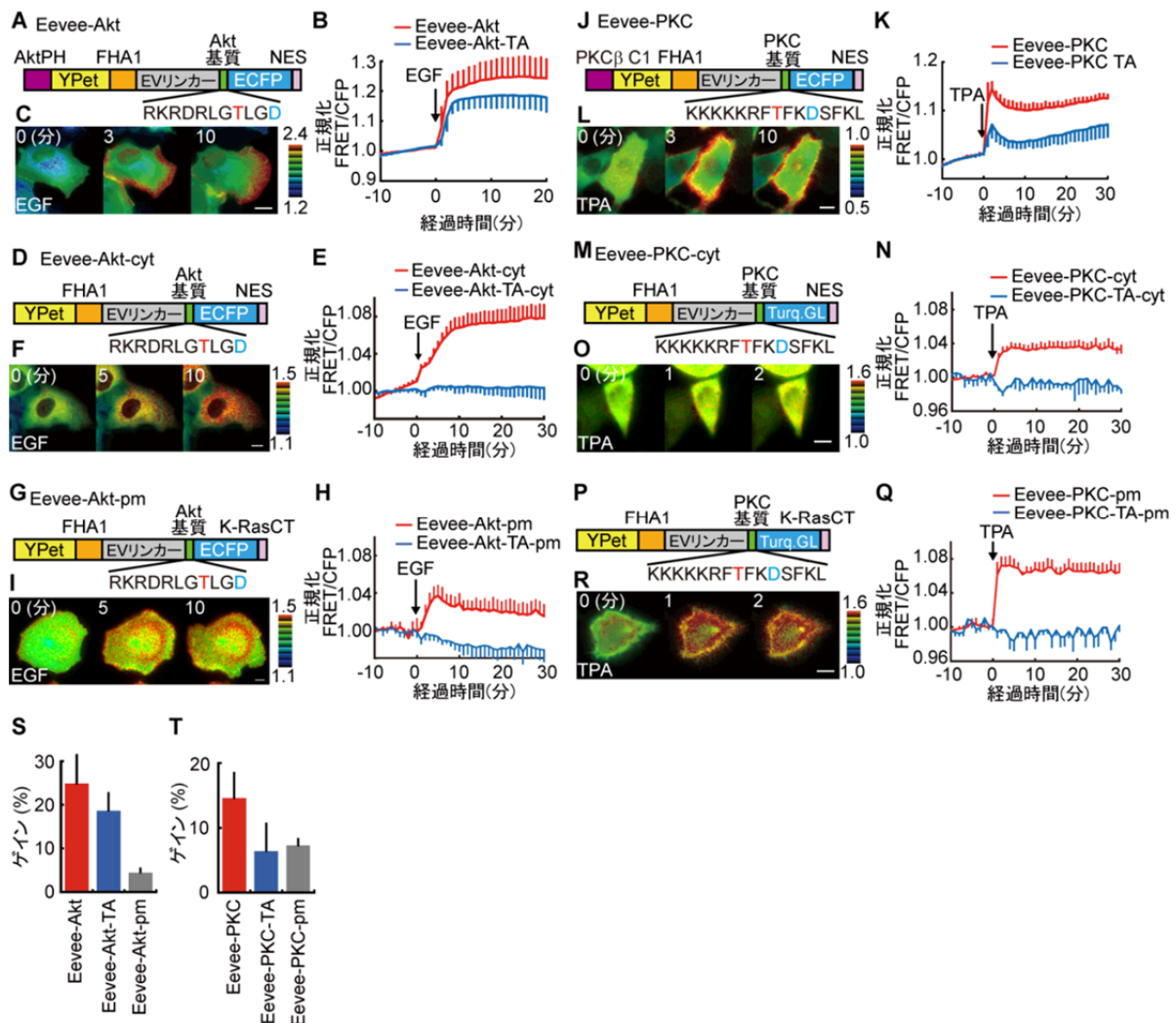


図 12. Eevee バックボーンに基づく新規 Akt FRET バイオセンサーおよび PKC FRET バイオセンサー

(A, D および G) Akt 活性センサー、Eevee-Akt の変異体および (J, M および P) PKC 活性センサー、Eevee-PKC 変異体の 1 次構造。赤文字はリン酸化をうけるサイト、青文字は FHA1 ドメインとの結合を促進するためのアミノ酸 1 置換を示す。(B, E および H) Eevee-Akt, Eevee-Akt-cyt および Eevee-Akt-pm を発現する Cos-7 細胞をそれぞれ 50 ng/ml EGF で刺激し、タイムラプス FRET イメージングを行った結果。(K, N および Q) Eevee-PKC, Eevee-PKC-cyt および Eevee-PKC-pm を発現する HeLa 細胞をそれぞれ 1 μM TPA で刺激し、タイムラプス FRET イメージングを行った結果。各細胞の FRET/CFP 比を刺激前の FRET/CFP 比の平均値にて正規化している。また 10 細胞以上からの正規化 FRET/CFP 比の平均を実線で、標準偏差をエラーバーで示している。青線はリン酸化されるスレオニンをアラニンに置換した変異体を示す。(C, F, I, L, O および R) 代表的な FRET/CFP レシオ画像。IMD モードにて FRET/CFP 比および蛍光強度を示している。スケールバーは 10 μm を示す。(次ページに続く)



(図 12 注釈 続き) (S および T) Eevee-Akt 変異体の EGF 刺激時におけるゲインの比較 (S) および Eevee-PKC 変異体の TPA 刺激時におけるゲインの比較 (T)。Eevee-Akt および Eevee-PKC の TA 変異体を示すゲインは基質配列のリン酸化に非依存的な FRET/CFP 比の上昇を反映している。

## Eevee バイオセンサーを発現する細胞株を用いたキナーゼ阻害剤の定量的評価

Eevee バックボーンにより得られた FRET バイオセンサーの有用性を示すため、本研究では最後に FRET バイオセンサーを利用した、Ser/Thr キナーゼ阻害剤の高効率・定量的な生細胞アッセイ系の開発を試みた。まず ERK 活性 FRET バイオセンサー EKAREV を安定発現する HeLa 細胞の樹立を行った。当研究室では以前にレトロウィルス/レンチウィルスを利用した遺伝子導入法、および線形化したプラスミド DNA のトランスフェクションによる 1 分子型 FRET バイオセンサーの安定発現株樹立を試みたがいずれも失敗であった。これはレトロウィルスゲノムが DNA に逆転写される際に YFP 遺伝子と CFP 遺伝子間で組み換えが起きる事に起因すると考えられた (データ無し)。一方、当研究室では *piggyBac* トランスポゾンシステムを利用することで 1 分子型 FRET バイオセンサーを培養細胞に安定発現可能であることを見いだした<sup>15</sup>。そこでこの方法を用いて HeLa 細胞に ERK 活性 FRET バイオセンサー、EKAREV の遺伝子導入を行った。続いて単一細胞由来の EKAREV 安定発現株を取得し、それを 96 穴ガラス底プレートに播種した。その後、細胞を EGF 刺激およびキナーゼ阻害剤にて処理した (図 13A)。薬剤添加後のプレートについて FRET イメージングを行ったところ、EGFR 阻害剤および MEK 阻害剤処理によって容量依存的な FRET/CFP 比の減少、すなわち ERK 活性の減少が観察された (図 13B,C および図 14)。これら阻害剤の FRET/CFP 比に対する IC<sub>50</sub> 値をフィッティングにより求めたところ、MEK 阻害剤、PD184352 の IC<sub>50</sub> 値は 0.83  $\mu$ M であった。この結果は *in vitro* kinase assay により測定された結果とほぼ同等であった<sup>34</sup>。EGFR 阻害剤は EGF 依存的な EKAREV の FRET/CFP 比の上昇を完全に抑制したが、MEK 阻害剤は 10  $\mu$ M でも部分的にしか抑制しなかった (図 13C,D および E)。EGF 依存的かつ MEK1/2 非依存的な経路の寄与、例えば ERK5 による EKAREV のリン酸化および EGF による脱リン酸化酵素の不活性化が原因として考えられるが、詳細は不明である。興味深いことに、EGFR 阻害剤である AG1478 および PD153035 を中濃度で加えると ERK 活性は二峰性の分布を示した。これは EGFR 阻害剤が ERK を全か無かの様式で阻害することを示唆している。一方、MEK 阻害剤である PD184352 を中濃度で加えた場合には ERK 活性は単峰性の分布を示した。このことは MEK 阻害剤が ERK 活性を段階的に抑制することを示唆している (図 13D および E)。以上の結果により、Eevee システムと *piggyBac* トランスポゾンシステムを利用することで簡便かつ定量的な生細胞ベースの薬剤評価系を構築できることが示された。



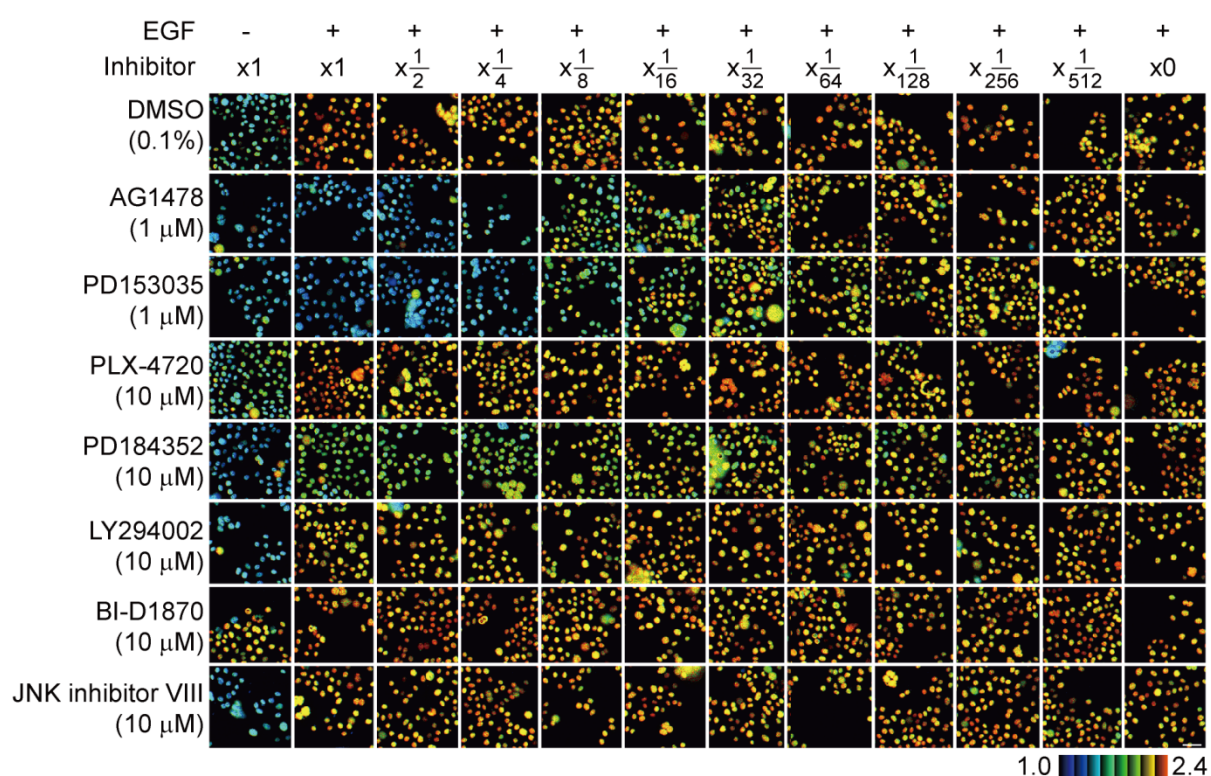


図14. ERK活性に対するキナーゼ阻害剤効果の評価実験

EKAREV-nls を安定発現するHeLa細胞を25 ng/ml EGF処理または無処理に加えてキナーゼ阻害剤を同時に加えた後に方法の章に記載した手法にて撮影を行った。用いたキナーゼ阻害剤の名称および標的キナーゼは以下の通り：AG1478 (EGFR阻害剤), PD153035 (EGFR阻害剤), PLX-4720 (Raf阻害剤), PD184352 (MEK阻害剤), LY294002 (PI3K阻害剤), BI-D1870 (RSK阻害剤), および JNK inhibitorVIII (JNK阻害剤). スケールバーは50 μmを示す。白線で囲まれた小区画内の輝点はEKAREV-nlsを発現する細胞の核である。

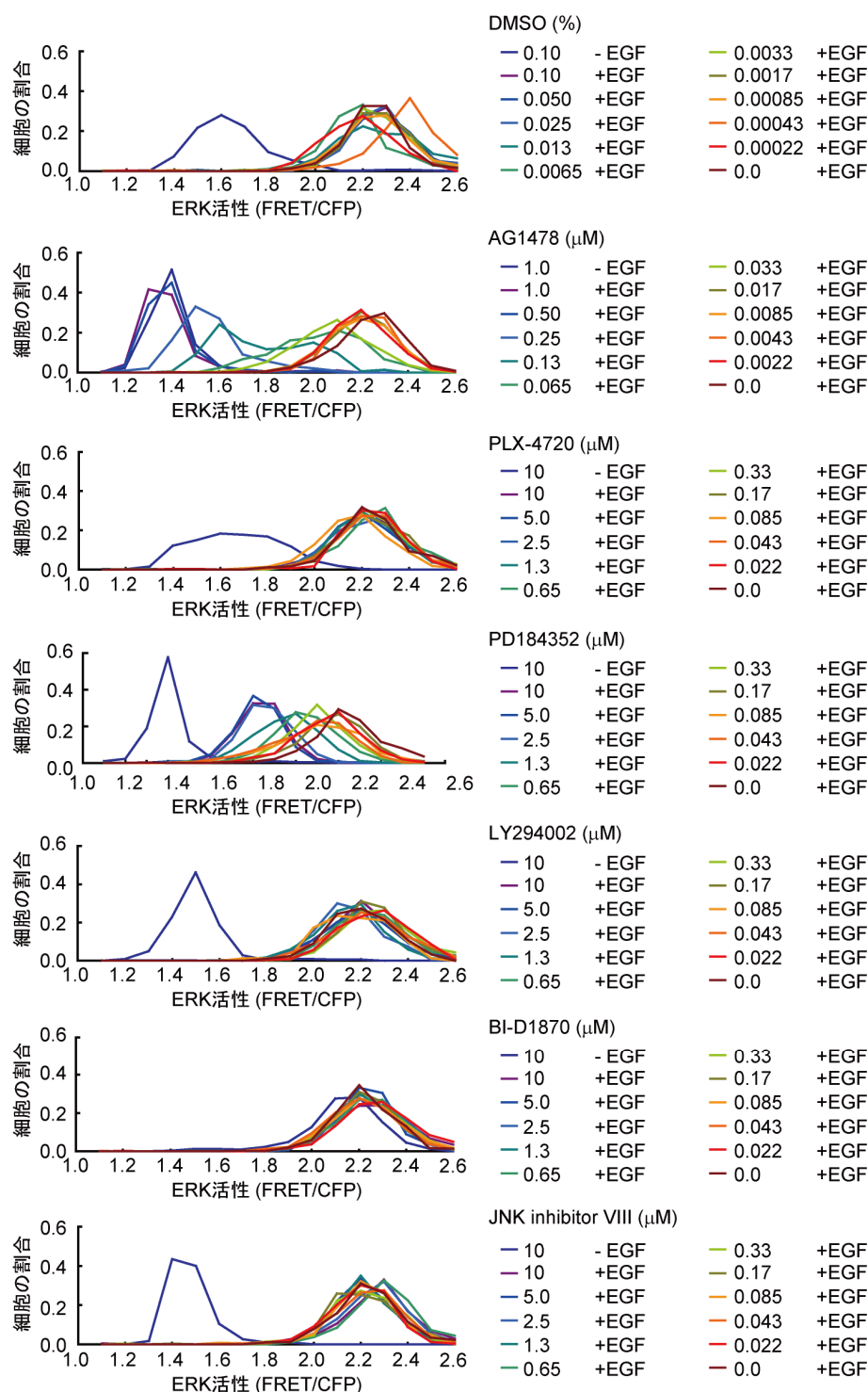


図 15. 単一細胞レベルにおいてキナーゼ阻害剤が ERK 活性の分布に与える影響

25 ng/ml EGF および図中に示した濃度の阻害剤で処理した細胞の FRET/CFP 比を定量し、ヒストグラムにて表示したもの(n > 80 細胞)。特に、EGFR 阻害剤である AG1478 および PD153035(図 13D)は ERK 活性に対して二峰性の応答を示している。その一方で、MEK 阻害剤である PD184352 は単峰性の段階的の応答を示す。加えて、BI-D1870 は EGF 無しでも ERK 活性を上昇させており、RSK から ERK への負のフィードバック機構の存在を示唆している。

## 考察

本研究では高感度 FRET バイオセンサーの開発を支援する共通バックボーンを作製した。まず柔軟かつ長いリンカーおよび最適化した蛍光タンパクペアが相乗的に FRET バイオセンサーのゲインを高めることを見だし、ゲインを最適化するリンカー長さおよび蛍光タンパクペアをもつバックボーン、Eevee を作製した。Eevee バックボーンは PKA, ERK, JNK, EGFR/Abl, Ras, および Rac1 に対する既存の FRET バイオセンサーの改良に有効であり (図 8 および図 9)、さらに RSK, S6K, Akt および PKC (図 11 および図 12) に対する新規 FRET バイオセンサーの開発にも有用であることを示した。

Eevee バックボーン開発における特筆すべき技術的進展は、柔軟な長いリンカーである EV リンカーの開発、およびこれを用いることで角度依存性のほとんど無い 1 分子型 FRET バイオセンサーを構築できた点である。これまでに円順列変異型蛍光タンパクがカルシウムイオン濃度および PKA 活性 FRET バイオセンサーの改良に有効であることが示されているが<sup>5,17</sup>、これらの結果は 1 分子型 FRET バイオセンサーではドナー・アクセプター蛍光タンパクの配向がゲインを増大させる上で極めて重要であることを示唆している。同様に、このような”角度依存型”FRET バイオセンサーでは FRET 効率が蛍光タンパク C 末端への 1 ないし数アミノ酸の挿入あるいは欠失により劇的に影響されるという報告がなされている<sup>35,36</sup>。しかしながら、角度依存型 FRET バイオセンサーを新規に開発する際に、適切な蛍光タンパク質の角度を予測することは少なくとも今は技術的に困難である<sup>10,33,37</sup>。これらを踏まえ、本研究では”距離依存型”FRET バイオセンサーの共通バックボーンを作製することとした。本研究で作製した Eevee 型バイオセンサーにおける FRET 効率の変化がほぼ完全に距離依存的であることは以下の理由により支持される: (1) Eevee バックボーンを適用した全ての FRET バイオセンサーはそれらの ON 状態において FRET 効率が上昇する。(2) 基底状態における FRET 効率はリンカーの長さに逆比例する (図 5B)。(3) Venus の円順列変異体を用いてもゲインが向上しない (図 3B)。

1 分子型 FRET バイオセンサーの開発ではその多くの場合において、基底状態における高い FRET 効率が観察され、しばしばバイオセンサー開発の障害となり得る。2 つの可能性が原因として考えられる。1 つ目はドナー蛍光タンパクとアクセプター蛍光タンパク間の距離が近すぎるために基底状態で相当量の FRET が起きている可能性である。2 つ目の可能性としては、リガンドドメインがセンサードメインに結合することで、脱リン酸化酵素や GAP といった制御因子からセンサードメインを遮蔽してしまい、結果 ON 状態(閉状態)の画分が増加することである。実際、低分子量 G タンパク質 RhoA のバイオセンサー、Raichu-RhoA では基底状態における GTP/GDP 結合比が RhoA 結合ドメインの RhoA に対する親和性に応じて劇的に変化することが示されている<sup>38</sup>。このことを踏まえると、柔軟かつ長いリンカーによる基底状態での FRET/CFP 比の減少はリンカーの導入によってリガンドドメインとセンサードメインの実効濃度が減少し、リガンドドメインによる遮蔽効果が低減することに起因すると考えられる。リンカーのアミノ酸

配列を変えることで FRET バイオセンサーを改良できる、という報告がすでになされている。例えば、佐藤らによって報告された“flip-flop”リンカーは 2 つの頑強な  $\alpha$ -ヘリックスリンカーを 2 残基のグリシンにて連結した構造からなる<sup>39</sup>。また、Grashoff らによって作製された“伸縮性”リンカーは蜘蛛の糸を構成する flagelliform タンパクからなるが<sup>40</sup>、これが FRET バイオセンサーのゲインを上昇させ得ることが示されている。しかしながらこれらのリンカーがリガンドドメインによる遮蔽効果を減少させることでゲインを上昇させるか否かについては現時点では不明である。

本研究では ECFP/YPet および Turquoise-GL/YPet の 2 種類の蛍光タンパクペアが距離依存型の 1 分子型 FRET バイオセンサーに適することを示した<sup>41</sup>。野生型のオワンクラゲ (*Aequorea*) 蛍光タンパクは高濃度にて同属のオワンクラゲ蛍光タンパクと 2 量体を形成し、その解離定数 ( $K_d$ ) は 110  $\mu$ M である<sup>42</sup>。最近、小寺らによってオワンクラゲ蛍光タンパクペアが有す可逆的な 2 量体化が数種類の 1 分子型 FRET バイオセンサーの FRET 効率を上昇させることが示された<sup>43</sup>。YPet をアクセプターとして用いた時の FRET ゲインの増加はこの同属蛍光タンパク間で 2 量体化をおこす性質に起因すると考えられる<sup>23</sup>。またこの報告にも合致するが、本研究にて YPet はサンゴの 1 種であるウミツタ (*Clavularia*) 由来蛍光タンパクである TFP<sup>3</sup> とペアにした場合に FRET 効率を上昇させなかったこともこの主張を支持している (図 3C)。

Eevee バックボーンを用いてセリン・スレオニンキナーゼ FRET バイオセンサーを開発する際には、標的となるセリン・スレオニンキナーゼに効率よく、かつ特異的にリン酸化される基質を探索する必要がある。本研究では S6K 活性センサーの開発にあたり、S6K の基質として知られている 2 種類の配列、S6 の S240 および Rictor の T1135 をバイオセンサーの基質候補として選んだ<sup>31,44</sup>。興味深いことに、Rictor 由来の基質を用いた FRET バイオセンサーは EGF による FRET/CFP 比の上昇、および Rapamycin 依存的な FRET/CFP 比の減少を示した (図 11D,E および F)。一方で、S6 由来の基質を用いたバイオセンサーは基質のリン酸化が不十分なために EGF に対する FRET/CFP 比の上昇を示さなかった (データ無し)。従って、標的とするキナーゼによって効率良く、かつ特異的にリン酸化される基質配列をスクリーニングすることがキナーゼ活性センサーを構築する上で重要な未解決の課題であるといえる。S6 S240 の基質については、そのままではリン酸化スレオニン結合ドメインである FHA1 と結合しないため、セリンをスレオニンに置換してバイオセンサーの基質として用いたが、この改変が基質のリン酸化効率を減少させた可能性がある。この根拠として、mTORC1 の基質である ULK1 の S758 に S758T の変異を導入したところ、ULK1 T758 変異型の脱リン酸化速度が野生型と比べて著しく上昇したという報告が一例としてあげられる<sup>45</sup>。FHA1 をリガンドドメインとするバイオセンサーの基質にはもともとスレオニンを含む配列が好ましいのかもしれない。こうした基質のリン酸化効率が低いという問題に関しては基質のスクリーニングに加えて次の 3 つの方策により克服できる可能性がある。1 つ目は細胞内局在ドメインを付加することによりバイオセンサーを標的となるキナーゼが活性化していると思われる細胞内画分に局在させる方法である。形質膜局在型の Eevee-PKC がその例として挙げられる (図 12Q)。2 つ目は、EKAREV や JNKAR1EV に代表されるように、標的

となるキナーゼと基質との結合を促進させるタンパク質モチーフを導入することである<sup>16,19</sup> (図 8B および C)。3 つ目は **FHA1** ドメインや **WW** ドメインに変異を導入することでリン酸化ペプチドとの親和性を高め、リガンドドメインによる遮蔽効果を高める方法である。レチノイン酸の濃度を検出する 1 分子型 **FRET** バイオセンサーにおいて、レチノイン酸結合ドメインに 2 箇所アミノ酸変異を導入することにより、レチノイン酸に対する親和性を変化させた例が報告されている<sup>46</sup>。

本研究では 1 分子型 **FRET** バイオセンサーの共通のバックボーンを開発した。この単純ながら多目的に利用可能なシステムは **FRET** バイオセンサーの効率的な作製に有用であり、細胞内シグナル伝達の時空間的な理解をさらに加速することが今後期待される。



## 謝辞

プラスミドを供与くださった、宮脇敦史博士、T.Akagi 博士、宮崎純一博士、遊佐宏介博士、Allan Bradley 博士、Jin Zhang 博士、Karel Svoboda 博士および Theodorus W.J. Gadella Jr 博士に感謝いたします。

森田康平さん、稲岡芳恵さん、平野鏡子さん、酒井理恵さん、野中奈津子さん、川岸亜希子さんには技術面でサポートして頂きました。お礼申し上げます。

実験、解析および論文執筆にあたり、貴重な意見や助言をくださった、生体制御学分野の皆様に感謝いたします。

小松 直貴

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Naoki Komatsu, Kazuhiro Aoki, Masashi Yamada, Hiroko Yukinaga, Yoshihisa Fujita, Yuji Kamioka and Michiyuki Matsuda  
Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases  
Molecular Biology of the Cell, vol.22 p.4647-4656 (2011)

## 参考文献

- 1 Jares-Erijman, E. A. & Jovin, T. M. FRET imaging. *Nature biotechnology* **21**, 1387-1395, doi:10.1038/nbt896 (2003).
- 2 Miyawaki, A. Visualization of the Spatial and Temporal Dynamics of Intracellular Signaling. *Dev Cell* **4**, 295-305 (2003).
- 3 Ai, H. W., Henderson, J. N., Remington, S. J. & Campbell, R. E. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *The Biochemical journal* **400**, 531-540, doi:10.1042/BJ20060874 (2006).
- 4 Aoki, K., Kiyokawa, E., Nakamura, T. & Matsuda, M. Visualization of growth signal transduction cascades in living cells with genetically encoded probes based on Forster resonance energy transfer. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363**, 2143-2151, doi:10.1098/rstb.2008.2267 (2008).
- 5 Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. & Miyawaki, A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 10554-10559, doi:10.1073/pnas.0400417101 (2004).
- 6 Karasawa, S., Araki, T., NAGAI, T., MIZUNO, H. & Miyawaki, A. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem. J.* **381**, 307-312 (2004).
- 7 Rizzo, M. A., Springer, G. H., Granada, B. & Piston, D. W. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature biotechnology* **22**, 445-449, doi:10.1038/nbt945 (2004).
- 8 Nguyen, A. W. & Daugherty, P. S. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nature biotechnology* **23**, 355-360, doi:10.1038/nbt1066 (2005).
- 9 Li, I. T., Pham, E. & Truong, K. Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnology letters* **28**, 1971-1982, doi:10.1007/s10529-006-9193-5 (2006).
- 10 Pham, E., Chiang, J., Li, I., Shum, W. & Truong, K. A computational tool for designing FRET protein biosensors by rigid-body sampling of their conformational space. *Structure* **15**, 515-523, doi:10.1016/j.str.2007.03.009 (2007).
- 11 Nagai, T. *et al.* A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature biotechnology* **20**, 87-90, doi:10.1038/Nbt0102-87 (2002).
- 12 Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *The Journal of biological chemistry* **276**, 29188-29194, doi:10.1074/jbc.M102815200 (2001).
- 13 Goedhart, J. *et al.* Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nature methods* **7**, 137-139, doi:10.1038/nmeth.1415 (2010).
- 14 Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199 (1991).
- 15 Yusa, K., Rad, R., Takeda, J. & Bradley, A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods* **6**, 363-369, doi:10.1038/nmeth.1323 (2009).

- 16 Harvey, C. D. *et al.* A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19264-19269, doi:10.1073/pnas.0804598105 (2008).
- 17 Allen, M. D. & Zhang, J. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochemical and biophysical research communications* **348**, 716-721, doi:10.1016/j.bbrc.2006.07.136 (2006).
- 18 Depry, C., Allen, M. D. & Zhang, J. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Molecular bioSystems* **7**, 52-58, doi:10.1039/c0mb00079e (2011).
- 19 Fosbrink, M., Aye-Han, N. N., Cheong, R., Levchenko, A. & Zhang, J. Visualization of JNK activity dynamics with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5459-5464, doi:10.1073/pnas.0909671107 (2010).
- 20 Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A. & Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* **461**, 997-1001, doi:10.1038/nature08446 (2009).
- 21 Mochizuki, N. *et al.* Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* **411**, 1065-1068, doi:Doi 10.1038/35082594 (2001).
- 22 Itoh, R. E. *et al.* Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Molecular and cellular biology* **22**, 6582-6591 (2002).
- 23 Ohashi, T., Galiacy, S. D., Briscoe, G. & Erickson, H. P. An experimental study of GFP-based FRET, with application to intrinsically unstructured proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* **16**, 1429-1438, doi:10.1110/ps.072845607 (2007).
- 24 Vinkenborg, J. L., Evers, T. H., Reulen, S. W., Meijer, E. W. & Merks, M. Enhanced sensitivity of FRET-based protease sensors by redesign of the GFP dimerization interface. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **8**, 1119-1121, doi:10.1002/cbic.200700109 (2007).
- 25 Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**, 749-757, doi:10.1074/mcp.T500024-MCP200 (2006).
- 26 Gotoh, T. *et al.* Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *The Journal of biological chemistry* **272**, 18602-18607 (1997).
- 27 Aoki, K. & Matsuda, M. Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature protocols* **4**, 1623-1631, doi:10.1038/nprot.2009.175 (2009).
- 28 Zhang, J., Ma, Y., Taylor, S. S. & Tsien, R. Y. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14997-15002, doi:10.1073/pnas.211566798 (2001).
- 29 Kurokawa, K. *et al.* A pair of fluorescent resonance energy transfer-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo. *The Journal of biological chemistry* **276**, 31305-31310, doi:10.1074/jbc.M104341200 (2001).
- 30 Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. & Blenis, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13489-13494, doi:10.1073/pnas.0405659101 (2004).

- 31 Dibble, C. C., Asara, J. M. & Manning, B. D. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* **29**, 5657-5670, doi:10.1128/MCB.00735-09 (2009).
- 32 Obata, T. *et al.* Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36108-36115, doi:10.1074/jbc.M005497200 (2000).
- 33 Kunkel, M. T., Ni, Q., Tsien, R. Y., Zhang, J. & Newton, A. C. Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5581-5587, doi:10.1074/jbc.M411534200 (2005).
- 34 Squires, M. S., Nixon, P. M. & Cook, S. J. Cell-cycle arrest by PD184352 requires inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 but not ERK5/BMK1. *The Biochemical journal* **366**, 673-680, doi:10.1042/BJ20020372 (2002).
- 35 Miyawaki, A. *et al.* Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**, 882-887 (1997).
- 36 Horikawa, K. *et al.* Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nature methods* **7**, 729-732, doi:10.1038/nmeth.1488 (2010).
- 37 Violin, J. D., Zhang, J., Tsien, R. Y. & Newton, A. C. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *The Journal of cell biology* **161**, 899-909, doi:10.1083/jcb.200302125 (2003).
- 38 Yoshizaki, H. *et al.* Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *The Journal of cell biology* **162**, 223-232, doi:10.1083/jcb.200212049 (2003).
- 39 Sato, M., Ueda, Y., Takagi, T. & Umezawa, Y. Production of PtdInsP3 at endomembranes is triggered by receptor endocytosis. *Nature cell biology* **5**, 1016-1022, doi:10.1038/ncb1054 (2003).
- 40 Grashoff, C. *et al.* Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* **466**, 263-266, doi:10.1038/nature09198 (2010).
- 41 Ouyang, M., Sun, J., Chien, S. & Wang, Y. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14353-14358, doi:10.1073/pnas.0807537105 (2008).
- 42 Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916, doi:10.1126/science.1068539 (2002).
- 43 Kotera, I., Iwasaki, T., Imamura, H., Noji, H. & Nagai, T. Reversible Dimerization of *Aequorea victoria* Fluorescent Proteins Increases the Dynamic Range of FRET-Based Indicators. *ACS CHEMICAL BIOLOGY* **5**, 215-222 (2010).
- 44 Ferrari, S., Bandi, H. R., Hofsteenge, J., Bussian, B. M. & Thomas, G. Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry* **266**, 22770-22775 (1991).
- 45 Kang, S. A. *et al.* mTORC1 phosphorylation sites encode their sensitivity to starvation and rapamycin. *Science* **341**, 1236566, doi:10.1126/science.1236566 (2013).
- 46 Shimosono, S., Iimura, T., Kitaguchi, T., Higashijima, S. & Miyawaki, A. Visualization of an endogenous retinoic acid gradient across embryonic development. *Nature* **496**, 363-366, doi:10.1038/nature12037 (2013).